

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Oktober 2003 (23.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/087294 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12N
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/03638
- (22) Internationales Anmeldedatum:
8. April 2003 (08.04.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 16 800.8 15. April 2002 (15.04.2002) DE
102 22 513.3 17. Mai 2002 (17.05.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EP-
PENDORF** [DE/DE]; Martinistrasse 52, 20246 Hamburg
(DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BLOCK, Andreas**
[DE/DE]; Lokstedter Steindamm 80, 22529 Hamburg
(DE).
- (74) Anwälte: **WEBER-QUITZAU, Martin** usw.; Uexküll &
Stolberg, Beselerstrasse 4, 22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

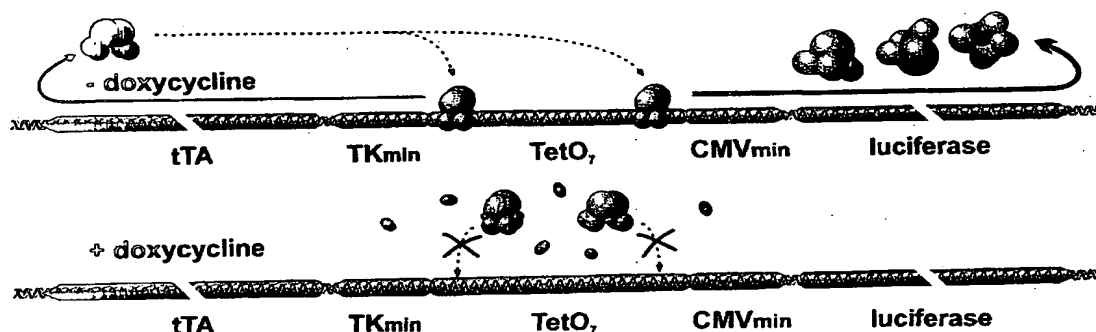
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: RECOMBINING VIRAL VECTORS FOR THE TETRACYCLINE-REGULATED EXPRESSION OF GENES

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTE VIRALE VEKTOREN ZUR TETRACYCLINREGULIERBAREN GENEXPRESSION

Tet-OFF system



(57) Abstract: The invention relates to recombining viral vectors which can be suppressed in a highly efficient manner by means of tetracycline or tetracycline derivatives, and the use thereof for expressing genes in eukaryotic cells, particularly within the framework of gene therapy.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft rekombinante virale Vektoren, die durch Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivate, wie z.B. Doxycyclin, hocheffizient supprimiert werden können, sowie deren Verwendung zur Durchführung einer Genexpression in Eukaryontenzellen, insbesondere im Rahmen einer Gentherapie.

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/087294 A2

Rekombinante virale Vektoren zur Tetracyclin-
regulierbaren Genexpression

Die Erfindung betrifft rekombinante virale Vektoren, die durch Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivate, wie z.B. Doxycyclin, hocheffizient supprimiert werden können, sowie deren Verwendung zur Durchführung einer Genexpression in Eukaryontenzellen, insbesondere im Rahmen einer Gentherapie.

Bösartige Erkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen des Menschen. Bei fortgeschrittenen und metastasierten soliden Tumorerkrankungen sind die therapeutischen Möglichkeiten immer noch sehr limitiert und das 5-Jahresüberleben vieler dieser Karzinomerkrankungen beträgt weniger als 10%. Daher stellt die metastasierte

Karzinomerkrankung eine der größten Herausforderungen in der experimentellen Medizin dar. Durch Einschleusen therapeutischer Gene in Tumorzellen eröffneten gentherapeutische Ansätze neue Perspektiven in der Therapie dieser Erkrankungen.

Adenoviren ermöglichen den effizienten Transfer und die Expression therapeutischer Gene in verschiedene Gewebe und Zelllinien. Insbesondere die Weiterentwicklung rekombinanter adenoviraler Vektoren hat die experimentellen Ansätze in der adenoviralen Gentherapie maligner Erkrankungen ermöglicht (K. Kozarsky, Curr Opin Genet Dev 3 (1993) 499-503).

Mit der hohen Effizienz des Gentransfers sind gentherapeutische Ansätze heute häufig durch die Toxizität infolge unkontrollierter Transgenexpression limitiert. Insbesondere bei der adenoviral vermittelten Expression von Zytokinen wie Interleukin-2, Interleukin-12, Interleukin-18 oder Tumor Nekrose Faktor α kann es auch bei intratumoraler Gabe der rekombinanten Adenoviren zu unerwarteten erheblichen systemischen Nebenwirkungen kommen. Eine den konstitutiven Promotoren (Cytomegalovirus-Promotor) vergleichbare Genexpression nach erfolgter adenoviraler Infektion mit rekombinanten Vektoren konnte bislang nicht effizient kontrolliert werden.

Gegenwärtig stellt das von M. Gossen et al. entwickelte Tet-System eines der am meisten geeigneten Mittel zur Kontrolle der Genexpression dar (M. Gossen et al., PNAS USA 89 (1992) 5547-5551; M. Gossen et al. Science 268 (1995) 1766-1769). Das Tet-System basiert auf zwei Elementen des E. coli Tet-Operons. Das Tetracyclin-induzierbare Repressorprotein (tetR)

wird mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 fusioniert. Dieses tTA Fusionsprotein interagiert mit der heptamerisierten tetO Operatorsequenz, was in der transkriptionellen Aktivierung der flankierenden minimalen Promotoren resultiert. Die Bindung von Tetracyclin und dessen Derivaten an die TetR-Domäne von tTA inhibiert die Wechselwirkung des Fusionsproteins mit dessen Operatorsequenzen, was zur Herunterregulierung der Transgen-Expression führt.

Die Verwendung des ursprünglichen tet-regulierten Genexpressionssystems in rekombinanten adenoviralen Vektoren (TC Harding et al. J. Neurochem. 69 (1997) 2620-2623; TC Harding et al. Nat. Biotechnol. 16 (1998) 553-555) brachte zwei wesentliche Hindernisse mit sich. Die limitierte Verpackungskapazität resultierte in unzureichender Aktivierung des CMV minimalen Promotors durch Verstärkungsinterferenz (S. Rubinchic et al. Gene Therapy 8 (2000) 875-885), und die konstitutionelle Transaktivator-Expression hatte eine mit VP16 zusammenhängende Toxizität zur Folge.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein für die Gentherapie von Tumorerkrankungen geeignetes Genexpressionssystem bereitzustellen, das die aus dem Stand der Technik bekannten Nachteile nicht aufweist. Insbesondere sollen (adeno-)virale Vektoren mit einem hohen Maß an Transgen-Expression bereitgestellt werden, die ferner die Möglichkeit bieten, dass diese Expression im Fall schwerwiegender Nebenwirkungen, die aus der Transgenexpression resultieren, effizient herunterreguliert

werden kann. Ferner sollen die Vektoren ein hohes Maß an Sicherheit bei der Anwendung aufweisen, insbesondere soll die aus dem Stand der Technik bekannte, mit VP16 zusammenhängende Toxizität vermieden werden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch einen rekombinanten viralen, insbesondere adenoviralen Vektor gelöst, der ein Insert enthält, das die allgemeine Struktur

tTA - Intron¹ - TK⁺ - TetO₂ - CMV⁺ - Intron² - Transgen

aufweist, wobei

TetO₂ der heptamerisierte Tetracyclin-Operator ist,

TK⁺ der minimale Thymidin Kinase-Promotor ist,

tTA eine Nukleinsäuresequenz ist, die für ein Fusionsprotein aus dem durch Tetracyclin induzierbaren Repressorprotein und der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 kodiert,

CMV⁺ der minimale Cytomegalievirus-Promotor ist und Transgen eine für ein nicht-virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz ist,

Intron¹ eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist und

Intron² eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist.

Für die Konstruktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Adenoviren wurde das Tetracyclin induzierbare Repressor-Protein (tetR) mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 fusioniert. Im Vordergrund steht dabei nicht mehr die Inhibition durch Bindung des tetR an das Operon, sondern die Positionierung des VP16 Transaktivators. Entsprechend wurde für die vorliegende Erfindung auch ein heptamerisiertes TetO Operon mit zwei flankierenden Minimalpromotoren verwendet. Dieses System (Fig. 1) führt zur autoregulierten Transaktivator-Expression im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus über einen der Minimalpromotoren. Gleichzeitig wird ein therapeutisches Transgen über den anderen flankierenden Minimalpromoter exprimiert. Doxycyclin und Tetracyclin binden an die tetR-Komponente und eine Änderung der sterischen Konformation führt zu einem Verlust der Bindung des tetR an den Operator. Die Dissoziation des Transaktivators von den Minimalpromotoren hat dann eine Reduktion der Genexpression zur Folge.

Mit den erfindungsgemäßen Vektoren wurde erstmals ein replikationsdefizientes adenovirales System auf Basis eines Vektors erzeugt und charakterisiert, bei dem eine autoregulierte Transaktivator-Expression erfolgt. Dieses System ermöglicht eine sehr strenge Kontrolle der Transgen-Expression durch Zugabe von Doxycyclin in nicht-toxischen Konzentrationen. Die hohe Suppression der Genexpression wurde über einen weiten m.o.i.-Bereich (multiplicity of infection) und in verschiedenen Karzinomzelllinien erreicht.

Der Anteil der Suppression hängt von der verwendeten Konzentration des Antibiotikums ab. Da eine maximale

Suppression der Transgenexpression bereits bei Doxycyclin-Konzentrationen von 2 µg/ml erzielt wurden, sind die erfindungsgemäßen Vektoren bestens zur klinischen Anwendung geeignet.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen genannten Vektor, bei dem das Insert in umgekehrter Orientierung in das virale Vektorgenom inseriert ist, d.h. in der Form

5'-Transgen-Intron²-CMV⁺-TetO₇-TK⁺-Intron¹-tTA-3'.

Ebenso ist es möglich, daß ausschließlich oder zusätzlich die Positionen von tTA und Transgen im Insert vertauscht sind.

Soweit die Sequenzelemente 'Intron¹' und/oder 'Intron²' vorhanden sind (d.h. > 0 bp), kann deren Länge im Bereich bis zu etwa 1000 bp unabhängig voneinander variieren und z.B. jeweils bis etwa 750, bis etwa 500 oder bis etwa 250 bp betragen. In diesem Fall werden die Promotoren üblicherweise innerhalb der jeweiligen Intronsequenz liegen.

Gemäß einer weiteren Alternative kann das Insert zwischen 'CMV⁺' und 'Intron²' oder zwischen 'Intron²' und 'Transgen' zusätzlich einen lac-Repressor (lacR) enthalten, wodurch eine weitere Regulationsmöglichkeit geschaffen wird.

Das verwendete Transgen ist eine für ein Fluoreszenzprotein, für Luciferase, Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-2 (IL-2), Tumor Nekrose Faktor α (TNF-α) oder Interferon-γ (IFN-γ) kodierende Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise single-chain Interleukin-12. Die Erfindung

betrifft ferner Vektoren, bei dem einer der flankierenden Promotoren zur Expression eines Genes zur Apoptose-Induktion, zur Expression des BAX Genes, zur Expression des FAS-L Genes, eines Suizid-Genes, wie Thymidin-Kinase-oder Cytosin-Deaminase-Gen, oder eines β -Galaktosidase-Genes verwendet wird.

Hinsichtlich des verwendeten Virusrückgrats eignet sich insbesondere ein Adenovirus, ein Adenoassoziiertes Adenovirus (AAV), ein Retrovirus, insbesondere ein Humanes Immundefizienzvirus (HIV), ein Herpes Simplex Virus, ein Hepatitis-B Virus oder ein Hepatitis C-Virus, wobei Adenoviren besonders bevorzugt sind.

Bei dem erfindungsgemäßen Vektor ist das Insert in die E1-Region eines rekombinanten Adenovirus einkloniert, alternativ eignen sich auch die E3- und/oder die E4-Region.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Vektor, der zum Beispiel durch homologe Rekombination eines viralen, insbesondere eines adenoviralen Plasmids und eines Expressionsplasmids mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz erhältlich ist. In diesem Zusammenhang steht "SEQ ID NO:" für die gemäß WIPO-Standard ST.25 verwendete Kennziffer <400>.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Expressionsplasmid mit der in SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz sowie dessen Verwendung zur Herstellung eines oben genannten, erfindungsgemäßen Vektors.

Wie bereits erwähnt eignen sich die Vektoren zur *in vitro*-Genexpression in eukaryoten Zelllinien oder, wenn 'Transgen' für ein therapeutisch wirksames Protein kodiert, zur Verwendung in der Gentherapie. Beispielsweise kann 'Transgen' IL-12 oder IL-18 sein, wodurch sich der Vektor zur Gentherapie maligner Erkrankungen eignet. Bei den malignen Erkrankungen handelt es sich insbesondere um einen soliden Tumor.

Bei den zuvor genannten Verwendungen wird die Genexpression mit Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivaten, insbesondere mit Doxycyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Methacyclin oder Minocyclin, reguliert. Soweit vorliegend Doxycyclin erwähnt ist, wird der Fachmann die Übertragbarkeit des erfindungsgemäßen Prinzips auf die oben genannten Tetracyclin-Derivate erkennen.

Weitere Vorteile der Erfindung:

Im Vergleich zu einer durch den im Stand der Technik stark verwendeten konstitutiven humanen Zytomegalivirus (HCMV) immediate-early Promotor getriebenen Expression des IL-12-Heterodimers wird bei den im Rahmen der Erfindung entwickelten Konstrukten in einer großen Zahl von Krebszelllinien eine bis zu 4000-fach höhere Zytokin-Sekretion beobachtet. Dieser unerwartete Effekt wird auf das Zusammenspiel aus der Wahl der Promotors und der Verwendung von genetisch erzeugtem und hoch-sekretorischem, einzelkettigem IL-12 zurückgeführt. Die IL-12-Expression in Abwesenheit von Doxycyclin war überraschenderweise ebenfalls den zuvor bereits veröffentlichten adenoviral infizierten murinen Tumorzellen unter Verwendung des CMV-Promotors zu

Regulierung der Expression des heterodimeren oder einzelkettigen mIL-12 überlegen. Da die Transduktion humaner Tumorzellen im Vergleich zu zuvor berichteten Werten aus präklinischen oder klinischen Versuchen bei den erfindungsgemäßen Konstrukten ebenfalls signifikant höher ist, wird somit vorliegend ein weiterer, äußerst vorteilhafter Effekt erzielt. Durch die Möglichkeit, die adenovirale Dosis der erfindungsgemäßen Vektoren zu reduzieren, lassen sich nämlich Vektor-spezifische Nebeneffekte vermindern, was zu einer höheren Sicherheit in der klinischen Anwendung führt.

Im Hinblick auf die gemäß einer besonderen Ausführungsform genutzte Interleukin-12-Expression (siehe unten) haben die erfindungsgemäßen adenoviralen Vektoren ferner den Vorteil, daß sie alle Voraussetzungen zur erfolgreichen gentherapeutischen Krebsbehandlung erfüllen. So wird durch Expression des einzelkettigen Interleukin-12, das, verglichen mit der allgemein verwendeten heterodimeren Form, eine ähnliche Bioaktivität aufweist, die Bildung von inhibitorischen p40-Homodimeren vermindert, und durch die schnelle Regulation der Genexpression im erfindungsgemäßen 3r-System durch effiziente Sekretion des einzelkettigen Interleukin-12 sichergestellt. Die äußerst effiziente, Doxycyclin-vermittelte Suppression der Expression des bioaktiven, einzelkettigen Interleukin-12 trägt somit zur Sicherheit bei der gentherapeutischen Krebsbehandlung bei.

Das erfindungsgemäße System zeichnet sich ferner dadurch aus, daß eine westliche Standardernährung das sensitive tet-OFF-System nicht beeinflußt wird, so daß mögliche Belastungen der

Nahrung mit Spuren an Tetracyclin oder dessen Derivaten im klinischen Umfeld kein Problem darstellen.

Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Vektoren ist die Anwesenheit von Transaktivatoren vor der Infektion mit den Vektoren nicht erforderlich, wodurch die Toxizität infolge der konstitutiven Expression des Transaktivators sowie eine gegenseitige Beeinflussung oder Störung der Transkription durch Doxycyclin-abhängige, autoregulative Genexpression vermieden wird. Demzufolge stellen die adenoviralen Vektoren der vorliegenden Erfindung ein wesentlich vielseitigeres und unaufwendigeres Hilfsmittel im Vergleich zu den im Stand der Technik bekannten Modellen der konstitutiven Transaktivator-Expression dar.

Ferner ist von Vorteil, daß die Doxycyclin-regulierte Genexpression nach adenoviraler Infektion einer großen Vielzahl nativer Säugerzelllinien oder Gewebe erfolgen kann. Die Autoregulation bewirkt ferner eine Beschränkung der ungewollten Transgen-Expression durch reduzierte Transaktivator-Expression bei Suppression durch Doxycyclin. Gegenüber den im Stand der Technik beschriebenen Ansätzen bieten die erfindungsgemäßen Vektoren den Vorteil, daß in Abwesenheit von Doxycyclin eine sehr hohe Transgen-Expression erreicht wird, während die Suppression der Transgen-Expression durch die Zugabe dieses Antibiotikums nicht beeinträchtigt wird, und bis zu 6000-fache Suppressions-Level erzielt werden.

Die erfindungsgemäßen Konstrukte lassen sich somit in vorteilhafter Weise zu Expression therapeutischer Transgene von bis zu 4,8 kB, einschließlich Apoptose-induzierender

Gene, verwenden und stellen damit ein wichtiges Mittel zur molekularen Therapie maligner Erkrankungen dar.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde ferner überraschenderweise festgestellt, daß die erfindungsgemäßen Vektoren eine mindestens 40-fach höhere Sensitivität gegenüber Tetracyclin aufweisen als die Detektionsgrenze in Standard-HPLC-Verfahren. Das erfindungsgemäße System eignet sich somit ferner als sensitiveres Hilfsmittel zum Nachweis sehr geringer Tetracyclinkonzentrationen in biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben und ist somit beispielsweise zum Einsatz in der human- und veterinärmedizinischen Diagnostik geeignet (vgl. N. Schultze et al. Nat. Biotechnol. 14 (1996) 499-503). Das Transgen kodiert in diesem Fall für ein Reporterprotein, wie z.B. Luciferase oder ähnliches. Gegenstand der Erfindung ist somit ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Vektoren, bei denen 'Transgen' für ein Reporterprotein kodiert, zum Nachweis von Tetracyclin oder einem Derivat desselben, wie z.B. Doxycyclin, in biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiele

Zelllinien

HeLa und 293 humane embryonale Nierenzellen wurden in HGD MEM (Gibco, Rockville, MD) kultiviert. Humane RT-4 Blasenkrebszellen und humane Colon Adenokarzinomzellen HT29 wurden in McCoy-Medium (Gibco) gehalten. MCF-7 und BT-20 humane Brustkrebszellen sowie humane Colon (Colo 205 und SkCO-1) und pankreatische Adenokarzinom- (Aspc-1) Zelllinien ließ man in RPMI-Medium (Gibco) wachsen. HepG2 humane hepatozelluläre Karzinomzellen wurden in MEM-Medium (Gibco) gehalten. Zellen wurden kultiviert und gemäß Standardvorschriften aufgeteilt. Alle Medien waren mit 10% fötalem Rinderserum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) und 1% Glutamin (Gibco) supplementiert. Die humane Myelomzelllinie U266 ließ man in RPMI-Medium wachsen, das mit 15% FBS (Clontech) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) supplementiert war.

Beispiel 1

Plasmidkonstruktion

DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese getrennt und aus der Agarose mit dem Gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) eluiert. DH5alpha-Zellen wurden zur Plasmidvermehrung eingesetzt. Plasmid-DNA wurde unter Verwendung eines modifizierten Protokolls für eine alkalische Lyse, gefolgt von einer Reinigung über eine kommerziell

erhältliche Ionenaustauschssäule nach Angaben des Herstellers (Qiagen), präpariert. Vor der Transfektion wurden LPS-Verunreinigungen in den Plasmid-DNA-Präparationen durch eine Triton X-117 Extraktionsmethode (M. Cotton et al., Gene therapy 1 (1994) 239-246) reduziert. Das Plasmid pBIG 3r, das das autoregulierte tTA Expressionssystem enthält, ist vorbeschrieben (C.A. Strathdee, Gene 229 (1999) 21-29). Die Luciferase cDNA wurde aus dem Plasmid pGL3basic (Promega, Madison, WI) durch BglII- und XbaI-Verdau erhalten und in pBIG 3r inseriert, das mit SpeI und BamHI gespalten wurde, was zur Erzeugung von pBIG 3r luc führte. Die adenovirale Plasmid pAd.CMV-Expressionskassette wurde durch Verdau mit XbaI und SalI nach Auffüllen mit T4 DNA-Polymerase entfernt. PBIG 3r luc wurde mit PvuII und SalI verdaut, und die Fragmente, die die bicistronische Expressionskassette enthielten, wurden in das Rückgrat von pAd.CMV-pA ligiert. Das resultierende adenovirale Plasmid pAd3r-luc enthielt die bidirektionale Expressionskassette, die an ihrem 5'-Ende durch die 1-456 bp des AD5-Genoms einschließlich Linker ITR und Verpackungssignale flankiert ist und die an ihrem 3'-Ende durch 3346-5865 bp des AD5-Genoms flankiert ist. Die von minimalen TK-Promotor getriebene Expression des tTA war antiparallel, und die durch den minimalen CMV-Promotor getriebene Expression des Luciferase-Gens war parallel zur adenoviralen E1-Transkription. Das Luciferase-Gen wurde aus pGL3-basic durch Verdau mit KpnI/SalI freigesetzt und in das adenovirale Expressionsplasmid pAd.CMV-pA ligiert, was zu pAd.CMV-luc führte. Die cDNA des einzelkettigen murinen Interleukin-12 wurde aus pSFG.IL-12.p40.L.p35 (G.J. Lieschke et al. Nat. Biotechnol. 15 (1997) 35-40) nach Verdau mit NcoI und EcoRV erhalten. Dieses Fragement wurde in den NheI/SalI-Ort von pAd.3r-luc subkloniert und ersetzte das Luciferase-

Gen. Das nachfolgend verwendete Plasmid pAd.CMV.p40.IRES.p35 enthält die zwei murinen IL-12 Untereinheiten, die durch eine Internal Ribosome Entry Site (IRES) des Enzephalomyocarditis-Virus getrennt sind. Die Expression dieses Konstrukts steht unter der Kontrolle des humanen Zytomegalovirus (CMV) Promotor-Elements von -601 bis -14 relativ zum Transkriptionsstart.

Beispiel 2

Erzeugung und Amplifikation rekombinanter adenoviraler Vektoren

Rekombinate E1- und E3-deletierte Adenoviren wurden erhalten und Plaque-gereinigt nach Kalziumphosphat-vermittelter Cotransfektion von pAd.3r-luc, pAd.CMV-luc, pAd.3r-scIL12 oder pAd.CMV.p40.IRES.p35 mit pBHG10 (AJ Bett et al., PNAS USA 91 (1994) 8802-8806). Die E1- und E3-deletierten Adenoviren wurden in 293-Zellen repliziert und durch CsCl-Zentrifugation wie zuvor beschrieben (FL Graham, Virology 54 (1973) 536-539) gereinigt. Die Titration der gereinigten Viren wurde mittels Plaque-Assay durchgeführt. Die resultierenden Titer für Ad.3r-luc, Ad.CMV-luc, Ad.3r-scIL12 und Ad.CMV-p40.IRES.p35 waren $1,0 \times 10^{10}$ p.f.u./ml (plaque forming units pro ml), $7,5 \times 10^9$ p.f.u./ml, $6,7 \times 10^9$ p.f.u./ml und $8,0 \times 10^9$ p.f.u./ml. Virale DNA wurde erhalten (Qiagen DANN Blood Kit) zur Sequenzanalyse, um die Insertion, die Transaktivator-Sequenz und die Orientierung zu bestätigen.

Beispiel 3

In vitro adenovirale Transfektion

HT29, Colo205, SkCO-1, AsPc-1, HepG2, MCF-7, BT-20, HeLa, RT4 und U266 Zellen wurden in Platten mit sechs und zwölf (U266) Kavitäten bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Kapazität 6 Stunden vor der Transfektion gesät. Die größeren HeLa-, RT-4- und 293-Zellen wurden bei einer Konzentration von 5×10^5 Zellen pro Kapazität gesät. U266-Myelomzellen wurden in Suspensionskultur wachsen gelassen und infiziert. Gereinigte virale Partikel wurden in Medien ohne Supplementierung verdünnt, und die Zellen wurden 500 μ l der geeigneten Virusverdünnung pro Kapazität für 1 Stunde ausgesetzt. Nach Entfernung des infektiösen Überstands wurden vollständige Medien, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Doxycyclin supplementiert waren, zugefügt. Die Medien wurden alle 24 Stunden gewechselt.

Beispiel 4

Quantifizierung der Transgen-Expression

24 Stunden nach Infektion mit Ad.CMV-luc oder Ad.3r-luc wurden die Zellen mit 150 μ l Zellkultur-Lysisreagens nach den Angaben des Herstellers (Promega) geerntet. Die Luciferase-Aktivität in 20 μ l Zell-Lysat wurde unter Verwendung eines Bertold LB9507 Luminometers und Luciferase-Assaysubstrat (Promega) gemessen. Die Standardkurven wurden unter Verwendung von rekombinanter Leuchtkäfer-Luciferase (Promega), das mit CCLR auf Konzentrationen von 1 pg/ml bis

300 ng/ml verdünnt war, erzeugt. Da die rlu bei höheren Konzentrationen ein Sättigungsprofil zeigen, wurde ein 2-Phasen exponentielles Assoziations-Kurvenfitting unter Verwendung des Prism Software-Pakets (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des DC-Protein-Assaykits (BioRad, Hercules, CA) bestimmt.

Die Quantifizierung des einzelkettigen und heterodimeren mIL12 in zellfreiem Überstand nach adenoviraler Infektion von Tumorzellen wurde durch einen IL12 p70 ELISA (OptEIA™, Pharmingen) durchgeführt, wobei gleiche Immunreaktivität und Molekulargewicht für beide Formen angenommen wurde. Splenozyten wurden mit Hilfe von Standardverfahren isoliert. Gehirnzellen wurden dann für drei Tage mit RPMI 1649 kultiviert, das mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin in anti-Maus CD3-beschichteten Kolben in Gegenwart von anti-human CD28 (5µg/ml) kultiviert, um T-Zellen anzureichern und die mIL-2-Sekretion zu stimulieren. Die Bioaktivität wurde nach Zugabe von 50-fach verdünntem konditionierten Überstand aus Ad.3r-scIL12 (+/- Doxycyclin), Ad.CMV-p40.IRES.p35 und mock-infizierten HT29-Zellen zu 4×10^4 murinen Splenozyten in einem finalen Volumen von 125 µl für 24 Stunden bestimmt. Murines IFN-γ wurde in Splenozyten-freiem Überstand unter Verwendung eines IFN-γ ELISA (OptEIA™, Pharmingen) quantifiziert. Um die spezifische Bioaktivität zu bestimmen, wurden halblogarithmische Verdünnungen von konditioniertem Überstand von beiden Formen des adenoviral exprimierten mIL-12 und Baculovirus-exprimiertem, gereinigtem mIL12 (R&D systems) auf mIL-12-Immunreaktivität (p70 ELISA) und IFN-γ-Induktion in Splenozyten wie beschrieben getestet. Die Bioaktivität von adenoviral exprimiertem heterodimerem

IL-12 kann durch die Bildung inhibitorischer p40-Homodimerer wie anderweitig beschrieben reduziert werden. Es wurde vorliegend kein Capture-Bioassay verwendet, um potentiell niedrigere Bioaktivität *in vivo* zu reflektieren.

Beispiel 5

Alternative Klonierungsstrategie

Klonierung von adenoviralen Expressionsplasmiden für die Virussyntese mittels AdEasy System

Als Alternative zu der beschriebenen Virussyntese wurden adenovirale Expressionsplasmide entwickelt, die eine Virusgeneration mittels AdEasy®-System (Stratagene) ermöglichen. Dazu wurde der pShuttle Vektor (Stratagene) mit KpnI verdaut, gebluntet, und nachfolgend mit SalI verdaut. Das 3r-Insert wurde aus pBIG3r mittels Verdau mit PvuII und SalI isoliert und in den pShuttle ligiert. Das resultierende Plasmid pShuttle3r ermöglicht die einfache Generation verschiedener adenoviraler Vektoren zur Doxyzyklin-supprimierbaren Genexpression. Das humane Single-Chain Interleukin-12 kann nachfolgend mittels XhoI in die multiple cloning site des pShuttle3r kloniert werden und resultiert in pShuttle3r-hscIL12 (siehe Abbildung).

Die Virusgeneration erfolgt dann durch homologe Rekombination mit pAdEasy-1® in BJS183 E. coli-Zellen und Selektion für Kanamycin. Nach Transfektion von 293 Zellen mit dem Rekombinationsprodukt entstehen in diesem System replikative rekombinante adenovirale Vektoren (T He, S Zhou et al. Proc Natl Acad Sci USA 95 (5): 2509-14).

Die Virusproduktion erfolgt dann wie vorbeschrieben in 293-Zellen.

Beispiel 6Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Immunblotting

Nach Infektion von HT29-Colon Krebszellen wurden Lysate auf 15% Acrylamid SDS-Gele nach Kochen in Laemmli-Probenpuffern unter reduzierenden Bedingungen geladen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf 0,45 µm Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) transferiert und mit TBS-enthaltender 5% nicht-fetter Trockenmilch für 1 Stunde geblockt. Actin und das Fusionsprotein tTA wurden unter Verwendung eines Kaninchen anti-Actin Affinitäts-isolierten Antigen-spezifischen Antikörpers (#A2066, Sigma, St. Louis, MS) und eines Maus anti-TetR monoklonalen Antikörpers (M. Gossen et al., PNAS USA 89 (1992) 5547-5551) (#8632-1, Clontech) nachgewiesen. Nach Inkubation für 1 Stunde wurden die Blots mit TBS-enthaltendem 0,1% Tween-20, pH 7,5, gewaschen und mit anti-Kaninchen und anti-Maus Peroxidase-verknüpften sekundären Antikörpern (Dianova, Hamburg, Deutschland) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Proteine wurden schließlich nach Waschen und Chemolumineszenz-Nachweis (SA Nesbitt et al. Anal. Biochem. 206 (1992) 267-272) (ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK) nach Vorschrift des Herstellers visualisiert.

Beispiel 7Tetracyclin-Screening von Blutspender-Seren

Eine Frau und sieben Männer im Alter zwischen 23 und 35 Jahren wurden als Probanden ausgewählt. Sie hatten für

mindestens einen Monat keine antiinfektiöse Behandlung erhalten. Alle waren gesund und unter einer westlichen Standardernährung. 50 ml peripheren venösen Bluts wurden entnommen, und das Serum wurde nach Standardverfahren erhalten. Die Seren unterliefen einem Gefrier-Auftau-Zyklus, bevor die Zellkultur-Experimente und Tetracyclin-Bestimmungen durchgeführt wurden. Humane Seren wurden anstelle von FBS den Zellkulturmedien zugegeben. Tetracyclin-HCl wurde von Fluca Chemicals (Fluca, Germany) gekauft. Bakerbond RP-18 Festphasenextraktions (SPE)-Säulen wurden von Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ) erhalten, Lösungsmittel in HPLC-Qualität und andere Chemikalien wurden von Merck (Whitehouse Station, NJ) gekauft. HPLC wurde an Constametric 3500 MS und RP-18 HyPURITY® ADVANCE-Säulen von ThermoQuest (Deutschland) durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung von Chemstation Software von Agilent (Deutschland) nach Vorkonditionierung der RP-18-Säulen mit 2 x 1 ml Methanol, gefolgt von 2 x 1 ml Wasser, wurden 3 ml Serum, das 0,1 mol/l Citratpuffer (pH 6,8) und 0,1 mol/l EDTA enthielt, bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. zugegeben. Die Säulen wurden dann mit 10 ml Wasser und 1 ml Methanol gewaschen. Tetracyclin wurde mit 4 ml Methanol, das 0,1% Trifluoressigsäure enthielt, eluiert (ME Sheridan et al. J. Chromatography 434 (1988) 253-258). Das Eluat wurde getrocknet und in 100 µl 0,01% Oxalsäure in Wasser/Acetonitril (98/2 v/v) bei einem mit HCl eingestellten pH-Wert von 2,0 rekonstituiert. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur und einer Fließgeschwindigkeit von 0,9 ml/min. durchgeführt. Die Fluoreszenz bei 416 nm (Anregung) und 515 nm (Emission) wurde durch Komplexbildung des Tetracyclins mit 0,2% (w/v) Zirkonium(IV)chlorid erreicht (K. De Wasch et al. Analyst 123 (1998) 2737-2741). Die Kalibrierung wurde mit

wässrigen Lösungen von Tetracyclin HCl von 2 bis 100 ng/ml mit Variationskoeffizienten von 6,3% (während eines Tages) und 8,5% (von einem Tag auf den anderen) für 10 ng/ml durchgeführt.

Resultate

Konstruktion von Doxycyclin-supprimierbaren, auto-regulierten adenoviralen Vektoren

Adenovirale Expressionsplasmide, die das Luciferase- und murine scIL-12-Gen unter Kontrolle des Tetracyclin-supprimierbaren autoregulierten Systems enthielten, pAd.3r-luc und pAd.3r-scIL-12 wurden erzeugt. Nach einem gleichen Verfahren wurden Plasmide erzeugt, die das Luciferase-Gen und die cDNA, die für murines p40 und p35, das durch einen Internal Ribosome Entry Site (IRES), jeweils unter Kontrolle des Zytomegalivirus (CMV)-Promotors, enthalten. Rekombinate E1/E3-deletierte Adenoviren Ad.3r-luc, Ad.3r-scIL12, Ad.CMV-luc und Ad.CMV-p40.IRES.p35 (Figur 2) wurden durch Cotransfektion adenoviraler Expressionsplasmide mit pBHG10 erzeugt. Die Plaque-Reinigung und Amplifizierung wurde in 293-Zellen durchgeführt. Adenovirale Titer wurden durch Standard-Plaque-Assay-Techniken quantifiziert. Isolierung, Amplifikation und Plaque-Assay von Ad.3r-scIL12 war in Gegenwart von 2 µg/ml Doxycyclin bis zu 87-fach höher, was auf die Toxizität nicht supprimierter scIL12-Expression in 293-Zellen hinweist (Figur 3). Im Gegensatz dazu hatte Doxycyclin keinen Einfluß auf die Titrierung von Ad.3r-luc.

Dosis-abhängige Doxycyclin-regulierte Luciferase- und Transaktivator-Genexpression

Humane Colon-Krebszellen HT29 sind gegenüber adenoveraler Transduktion äußerst empfänglich, wie bereits zuvor gezeigt (A. Block et al. Cancer Gene Therapy 7 (2000) 438-445). Diese Zellen wurden mit Ad.3r-luc bei einer m.o.i. (multiplicity of infection) von 30 nach Inkubation mit Doxycyclin bei verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden infiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde in Zelllysaten entsprechend dem gelösten Zellprotein bestimmt. Bereits geringe Doxycyclin-Konzentrationen wie 100 pg/ml führen zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression. Die Genexpression wurde schließlich mit Doxycyclin-Konzentrationen von bis zu 3 µg/ml maximal supprimiert (Figur 4). Diese Doxycyclin-Konzentration wird üblicherweise in der klinischen Behandlung bakterieller Infektionen verwendet. Im vorliegenden experimentellen Ansatz lag eine bis zu 2400-fache Doxycyclin-vermittelte Suppression der Transgen-Expression vor.

Die dosis-abhängige, Doxycyclin-regulierte Suppression der positiven Feedback-Schleife (Figur 1) wurde durch Nachweis der tTA Fusionsproteine mit Tet-R monoklonalen (M. Gossen et al., PNAS U.S.A. 89 (1992) 5547-5551) und VP16 polyklonalen Antikörpern (PE Pellett et al. PNAS U.S.A. 82 (1985) 5870-5874) in Western Blot-Analysen illustriert (Figur 5). Steigende Doxycyclin-Konzentrationen führten zu einer Herunterregulierung der intrazellulären tTA-Anteile, was mit einer verminderten Luciferase-Genexpression korreliert.

M.O.I.-abhängige, supprimierbare Luciferase-Expression

HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-luc bei einer m.o.i. im Bereich von 0,1 bis 100 nach Inkubation in Gegenwart oder Abwesenheit von Doxycyclin bei 2 µg/ml für 24 Stunden infiziert. Die Suppression der Luciferase-Gen-Expression in Lysaten von Ad.3r-luc-infizierten HT29-Zellen bewegte sich von 470 (m.o.i.: 0,3) bis 2400-fach (m.o.i.: 10 - 100) (Figur 6). Das Ausmaß der Suppression blieb bei hohen m.o.i. konstant, was für eine ausreichende, mit der Transgen-Expression zusammenhängende Toxizitätskontrolle entscheidend ist. Doxycyclinkonzentrationen von 2 µg/ml störten die adenovirale Genexpression in HT29-Zellen unter Verwendung des konstitutiven CMV-Promotors nicht. Um die Effizienz der Ad.3r-luc-vermittelten transgenen-Expression in Abwesenheit von Doxycyclin zu untersuchen, wurde die Expression mit der Expression in HT29-Zellen verglichen, die mit Ad.CMV-luc infiziert waren (Figur 7). In HT29 zeigte Ad.3r-luc eine höhere Genexpression als Ad.CMV-luc über alle getesteten m.o.i. (1 - 100), wobei der Faktor zwischen 18-fach (m.o.i.:100) und 240-fach (m.o.i.:1) lag.

M.O.I.-abhängige regulierte Expression des einzelkettigen murinen Interleukin-12

HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-scIL-12 bei einer m.o.i. im Bereich von 1 bis 100 infiziert und in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 µg/ml Doxycyclin für 24 Stunden inkubiert. Die Genexpression von ScIL-12 wurde um mehr als 1400-fach bei einer m.o.i. von 100 in Gegenwart von Doxycyclin suprimiert (Figur 8). Die Western Blot-Analyse zeigte eine mit der IL-12 Expression korrelierende Transaktivator (tTA)-Expression

(Figur 9). Nicht-supprimierte 3r-vermittelte IL-12 Genexpression war 11-fach (m.o.i.:1) bis 375-fach (m.o.i.:100) höher als unter Verwendung des konstitutiven CMV-Promotors, wobei von gleicher Immunreaktivität des p70-ELISA gegenüber dem einzelkettigen Interleukin-12 und der CMV-gesteuerten Expression eines p40/p35-Heterotrimer ausgegangen wurde. Die Bioaktivität beider Formen wurde durch Inkubation muriner Splenocyten mit 50-fach verdünnten konditionierten Medien nach Infektion von HT29 mit IL-12 exprimierenden Adenoviren quantifiziert (Figur 10). Es wurde eine hohe Interferon- γ (IFN- γ)-Sekretion der Splenocyten durch Inkubation mit konditionierten Medien nach Infektion von HT29 mit Ad.3r-sc-IL-12 erhalten. Diese IFN- γ -Induktion war verglichen mit der Infektion von HT29 mit dem gewöhnlich verwendeten Ad.CMV-p40.IRES.p35 signifikant höher. Die Zugabe von Doxycyclin resultierte in einer Suppression von IFN- γ auf einen Hintergrund-Level. Ferner wurde die spezifische Bioaktivität adenoviral exprimierter Formen von IL-12 im Vergleich zu rekombinant gereinigten p40/p35-Heterodimeren analysiert (Figur 11). Murine Splenocyten wurden mit halblogarithmischen Verdünnungen von rekombinant heterodimerem IL-12 oder konditionierte Medien enthaltendem IL-12 wie beschrieben inkubiert. Die IFN- γ -Induktion korrelierte mit der Immunreaktivität von IL-12 in den Medien, wie durch p70-ELISA nachgewiesen wurde. Die basale Induktion wurde durch Präinkubation von Splenocyten mit Anti-humanen CD28-Antikörpern verursacht, was zur IL-2-Expression und nachfolgenden IFN- γ -Induktion führte (CH June et al., J. Immunol. 143 (1989) 153-161). Die Bioaktivität des murinen einzelkettigen IL-12 Fusionsproteins war mit dem gereinigten, rekombinanten p40/p35-Heterodimer vergleichbar. Die

reduzierte Bioaktivität von IL-12, das nach Infektion mit dem gewöhnlich verwendeten Ad.CMV-p40.HRES.p35 exprimiert wurde, erklärt sich durch inhibitorische p40-Homodimere (P. Ling et al J. Immunol. 154 (1995) 116-127; S. Gillesen et al. European J. Immunol. 25 (1995) 200-206; F. Mattner et al. European J. Immunol. 23 (1993) 2202-2208).

Regulierte Interleukin-12 Genexpression in vitro

Verschiedene Zelllinien des humanen Colon Karzinom (HT29, SkCo-1 und Colo205), pankreatischen Karzinom (Aspc-1), Blasen-Karzinom (RT4), Cervix-Karzinom (HeLa), Brust-Karzinom (MCF-7 und BT-20) sowie Myelom (U266) und hepatozelluläres Karzinom (HepG2) wurden entweder mit Ad. CMV.p40.IRES.p35 oder Ad.3r-scIL-12 infiziert und in Gegenwart oder Abwesenheit von Doxycyclin inkubiert. Die Expression des rekombinanten Interleukin-12 wurde unter Verwendung eines p70-ELISA wie zuvor beschrieben bestimmt (Figur 12). Die Doxycyclin-vermittelte Suppression der Interleukin-12-Expression trat in allen Zelllinien auf. In Abwesenheit von Doxycyclin erwies sich der 3r-Promotor gegenüber dem CMV-Promotor in allen Zelllinien mit Ausnahme der U266-Myelomzelllinie als überragend. Die Interleukin-12-Expression in Mock-transfizierten Zelllinien wurde nicht nachgewiesen. Die Suppression des IL-12 war 3,9-fach in U266 und bewegte sich von 167 (HepG2) bis 6000-fach (Aspc-1). Mit Ausnahme von U266, wo eine gegenüber der CMV-vermittelten IL-12-Expression signifikant geringere 3r-vermittelte IL-12 Expression vorlag, führte der 3r-Promotor in allen anderen Krebszelllinien zu 17-fach (SkCo-1) bis 4254-fach (Colo205) höherer Genexpression in Abwesenheit von Doxycyclin.

Regulierte Genexpression nach Inkubation mit Humanserum

In Abetracht der geringen Doxycyclin- und Tetracyclin (tet)-Konzentrationen, die zur Suppression der Transgen-Expression erforderlich sind, wurde die Regulation in humanen Colon-Krebszellen in Gegenwart von humanem Serum untersucht, um die Anwendbarkeit dieses Ansatzes in einem möglichen klinischen Umfeld zu prüfen. Serumproben von gesunden Probanden, die sich einer westlichen Standardernährung unterzogen, wurden unter Verwendung eines Standard HPLC-Verfahrens mit einer maximalen Sensitivität von 2 ng/ml auf Tetracyclin getestet, da Tetracyclin in der Nutztierhaltung breite Anwendung findet und eine Kontamination von Nahrungsmitteln anzunehmen ist. Die HPLC zeigte keine signifikanten Tetracyclin-Konzentrationen in allen getesteten Proben. HT29-Colon-Karzinomzellen, die nach Inkubation mit diesen humanen Seren mit Ad.3r-luc (m.o.i.: 30) infiziert wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Transgenexpression verglichen mit zertifiziertem, Tetracyclin-freiem fötalem Rinderserum (Figur 13). Diese Beobachtung spiegelt Tetracyclin-Konzentrationen in humanen Serumproben von weniger als 10 pg/ml wieder. Wie erwartet, führte die Supplementierung dieser Humansenen mit Doxycyclin (2 µg/ml) zu einer äußerst effizienten Suppression der Transgen-Expression.

Beschreibung der Figuren

Figur 1. Prinzip einer autoregulierten, Tetracyclin-abhängigen Transaktivator-Expression. Der bidirektional tet-responsive Promotor kontrolliert sowohl das Transgen als auch die Transaktivator-Expression. Bindung des Transaktivators in Abwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin resultiert in einer Amplifikation der Transaktivator-Expression durch eine positive Feedback-Schleife, ebenso wie in einer Induktion der Transgen-Expression. tTA, Tet-Repressor und VP16 Fusionsproteine; TKmin, minimaler Thymidin-Kinase-Promotor; CMVmin, minimaler Zytomegalovirus-Promotor; TetO₇, heptamerisierter Tet-Operator.

Figur 2. Adenovirale Vektorkarten. Die autoregulierte Tetracyclin-Expressionskassette ist in die $\Delta E1$ -Region des adenoviralen Genoms inseriert. Zur Vermeidung von kryptischem Splicing und um RNA-Stabilität zu erhalten (Ad.3r-luc und Ad.3r-scIL12) wurde ein Intron aufwärts vom Aktivator und dem Luciferase- oder Interleukin-12-Gen aus der Maus eingefügt. Zusätzlich wurden rekombinate adenovirale Vektoren für die Expression des Luciferase- oder des heterodimeren Interleukin-12-Gens der Maus unter der Kontrolle des CMV-Promotors konstruiert (Ad.CMV-luc und Ad.CMV-p40.IRES.p35). E1 und E3, Early regions des adenoviralen Genoms; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; CMV, Zytomegalievirus-Promotor; TK, Thymidin-Kinase-Promotor.

Figur 3. Plaque-Assay von Ad.3r-scIL12 in An- und Abwesenheit von Doxycyclin in einer Konzentration von 2 μ g/ml. Titration von Ad.3r-scIL12 in 293-Zellen resultiert in einer erheblich

höheren Ausbeute, wenn die Expression des Transgens durch Zugabe von Doxycyclin unterdrückt wird. Dox, Doxycyclin.

Figur 4. Dosisabhängige Luciferase-Expression nach Infektion von HT29 Dickdarmkrebszellen mit Ad.3r-luc gefolgt von verschiedenen Konzentrationen des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin.

Figur 5. Westernblot-Analysen des Transaktivators zeigen die positive Rückkoppelungsschleife nach adenoviraler Infektion von HT29-Zellen unter Inkubation mit unterschiedlichen Mengen von Doxycyclin. Die Figur zeigt die Unterdrückung der Expression des tTA Fusionsproteins in Anwesenheit von Doxycyclin. dox, Doxycyclin.

Figur 6. Unterdrückung der Luciferase-Genexpression nach Infektion von HT29-Zellen mit verschiedenen Multiplizitäten der Infektion (multiplicities of infection, m.o.i.). Doxycyclin-regulierte Genexpression wird in einem großen Infektionsbereich von wenigstens 0,1 bis 100 m.o.i. erzielt, die in einer 470- bis 2400-fachen Unterdrückung der Luciferase-Expression resultiert.

Figur 7. Vergleich der 3r-vermittelten Transgen-Expression bei Verwendung des konstitutiven Zytomegalievirus-Promotors. HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-luc oder Ad.CMV-luc in verschiedenen m.o.i. infiziert, gefolgt von einer Inkubation in Doxycyclin-freiem Medium.

Figur 8. Interleukin-12-Expression in HT29-Zellen nach Infektion mit Ad.3r-scIL12 in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin (2 µg/ml) oder Ad.CMV-mIL12 bei verschiedenen

m.o.i. Wie mit Luciferase-exprimierenden adenoviralen Vektoren gezeigt wurde, befindet sich in HT29 eine erheblich höhere Interleukin-12-Expression, wenn der 3r-Promotor verwendet wird. Zugabe von Doxycyclin führt zu einer Unterdrückung der Transgen-Expression unter das Niveau, das mit Ad.CMV-p40.IRES.p35 bei der selben m.o.i. erzielt wird.

Figur 9. Westernblot-Analyse der tTA Transaktivator-Genexpression in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin nach Infektion mit Ad.3r-scIL12 bei verschiedenen m.o.i.. Beide Domänen des tTA Fusionsproteins wurden mit den TetT- und VP16-Antikörpern nachgewiesen. Die Expression des tTA Fusionsproteins korreliert mit der eingesetzten m.o.i.. Zugabe von Doxycyclin in einer Konzentration von 2 µg/ml resultiert in einer Unterdrückung der tTA Expression. TetR, Tetracyclin-Repressor; VP16, Herpes simplex Virus transkriptionale Aktivierungsdomäne.

Figur 10. Induzierung der Interferon-γ-Expression nach Inkubation von Splenozyten mit konditioniertem Überstand von infizierten HT29-Zellen. 10⁶ HT29-Zellen wurden mit Ad3r-scIL12 (+/- Dox) oder Ad.CMV-p40.IRES.p35 bei einer m.o.i. von 30 für 24h infiziert. Infektion von HT29 mit Ad.3r-scIL12 resultiert in einer starken Interferon-γ-Induktion im Vergleich zu einer Infektion mit Ad.CMV-p40.IRES.p35. Zugabe von Doxycyclin resultiert in einer Abnahme des Interferon-γ auf Hintergrundniveau in diesem Versuchsansatz.

Figur 11. Vergleich der Interferon-γ-Induktion durch adenoviral-exprimiertes Einzelketten- (single-chain), bzw. heterodimeres Interleukin-12, sowie durch aufgereinigtes rekombinantes Interleukin-12. Interleukin-12 im

konditionierten Überstand von infizierten HT29-Zellen wurde durch p70-mIL12 ELISA bestimmt. Mäuse-Splenozyten wurden dann mit seriellen Verdünnungen von entweder adenoviral exprimierten oder rekombinanten Interleukinen inkubiert und das induzierte Interferon- γ wurde mit mIFN- γ ELISA quantifiziert. Die Bioaktivität-Immunoreaktivität von Einzelketten-Interleukin-12 war vergleichbar zu rekombinantem aufgereinigtem heterodimerem Interleukin-12. Die spezifische Bioaktivität von adenoviral produziertem heterodimerem Interleukin-12 (Ad.CMV-p40.IRES.p35) scheint niedriger zu sein, wahrscheinlich durch inhibitorische p40 Homodimere.

Figur 12. Interleukin-12-Expression in verschiedenen Zelllinien nach Infektion mit entweder Ad.CMV-p40.IRES.p35 oder Ad.3r-scIL12 in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin. Unterschiedliche Stärken der Transgenexpression beruhen z.T. auf Unterschieden in der Transduktionseffizienz. Mit Ausnahme der U266 Myelomzelllinie war die 3r-vermittelte Genexpression deutlich höher als die CMV-vermittelte Expression.

Figur 13. Inkubation von Ad.3r-luc infizierten HT29 Dickdarmkarzinomzellen mit menschlichen Seren anstatt zertifiziertem Tetracyclin-freiem fötalem Rinderserum. Es gab keine signifikanten Unterschiede bei der Verwendung von menschlichem Serum von Probanden mit einer standardisierten westlichen Ernährung im Vergleich mit zertifiziertem Tetracyclin-freiem fötalem Kälberserum. Diese Daten legen eine Tetracyclin-Konzentration bei den menschlichen Probanden von unter 50 pg/ml nahe. Die Ergänzung der menschlichen Sera mit Doxycyclin (2 μ g/ml) resultiert in einer Unterdrückung der Transgen-Expression wie vorgehend gezeigt. FCS, fötales Kälberserum.

Patentansprüche

1. Rekombinanter viraler Vektor, der ein Insert enthält, das die allgemeine Struktur

tTA - Intron¹ - TK^{*} - TetO₂ - CMV^{*} - Intron² - Transgen

aufweist, wobei

TetO₂ der heptamerisierte Tetracyclin-Operator ist,

TK^{*} der minimale Thymidin Kinase-Promotor ist,

tTA eine Nukleinsäuresequenz ist, die für ein Fusionsprotein aus dem durch Tetracyclin induzierbaren Repressorprotein und der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 kodiert,

CMV^{*} der minimale Cytomegalievirus-Promotor ist und

Transgen eine für ein nicht-virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz ist,

Intron¹ eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist und

Intron² eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist.

2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Insert in umgekehrter Orientierung in das virale Vektorgenom inseriert ist.

3. Vektor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen von tTA und Transgen im Insert vertauscht sind.
4. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Insert zwischen 'CMV' und 'Intron²' oder zwischen 'Intron²' und 'Transgen' zusätzlich einen lac-Repressor (lacR) enthält.
5. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Transgen eine für ein Fluoreszenzprotein, für Luciferase, Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-2 (IL-2), Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) oder Interferon- γ (IFN- γ) kodierende Nukleinsäuresequenz ist.
6. Vektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß IL-12 ein single-chain Interleukin-12 ist.
7. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Adenovirus, ein Adenoassoziiertes Adenovirus (AAV), ein Retrovirus, insbesondere ein Humanes Immundefizienzvirus (HIV), ein Herpes Simplex Virus, ein Hepatitis-B Virus oder ein Hepatitis C-Virus ist.
8. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Insert in die E1- und/oder die E3-Region eines rekombinanten Adenovirus einkloniert ist.
9. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß er durch homologe Rekombination eines

viralen Plasmids und eines Expressionsplasmids mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz erhältlich ist.

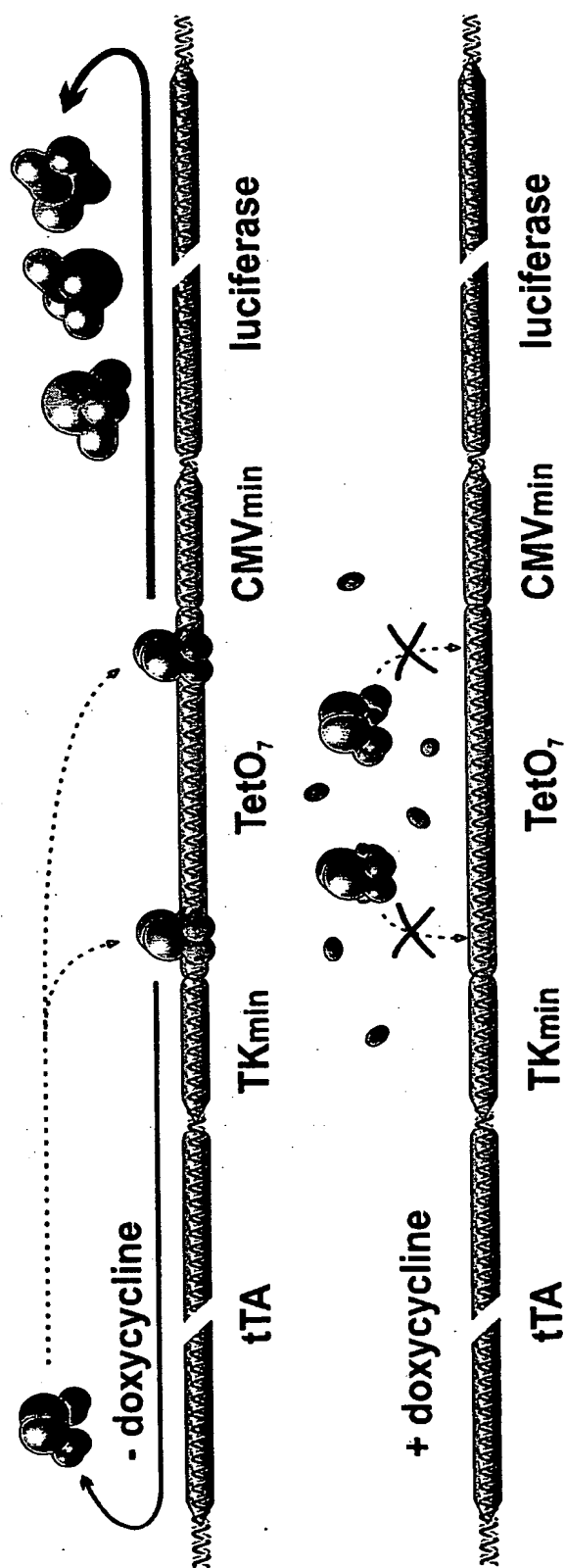
10. Expressionsplasmid mit der in SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz.
11. Verwendung eines Plasmids nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Vektors nach den Ansprüchen 1 bis 9.
12. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9 zur *in vitro*-Genexpression in eukaryoten Zelllinien.
13. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9, bei denen 'Transgen' für ein therapeutisch wirksames Protein kodiert, in der Gentherapie.
14. Verwendung nach Anspruch 13, bei dem das Transgen IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α oder IFN- γ ist, zur Gentherapie maligner Erkrankungen.
15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die maligne Erkrankung ein solider Tumor ist.
16. Verwendung nach den Ansprüchen 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man die Genexpression mit Doxycyclin, Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Methacyclin oder Minocyclin, reguliert.
17. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9, bei denen 'Transgen' für ein Reporterprotein kodiert, zum Nachweis von Tetracyclin oder einem Derivat desselben in

biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Derivat Doxycyclin ist.

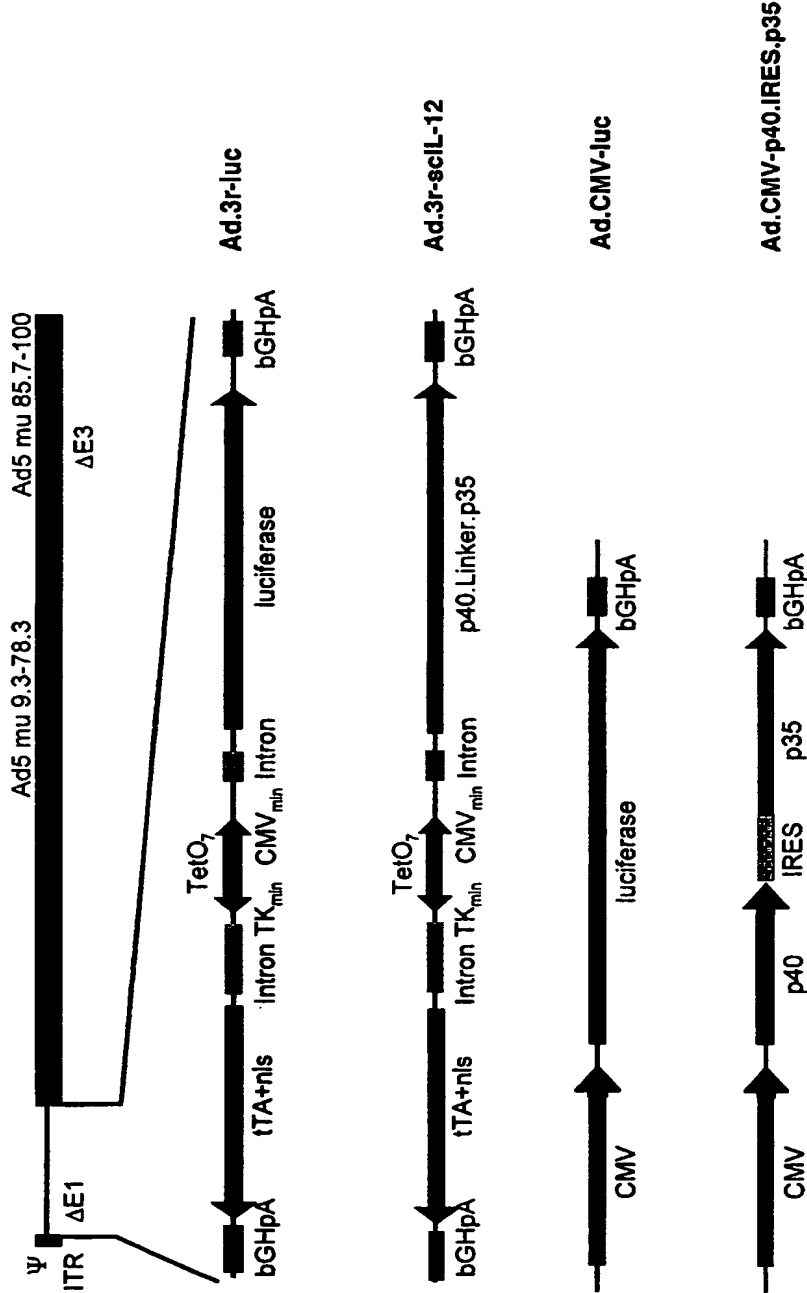
Block et al. 2002

Figure 1
Tet-OFF system

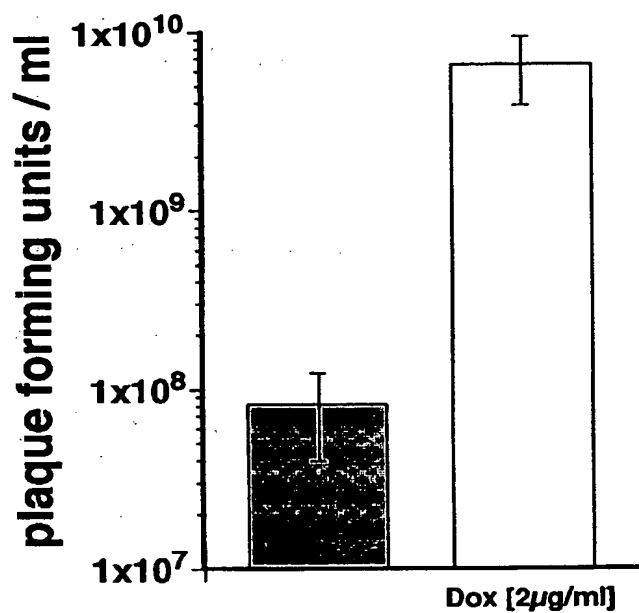
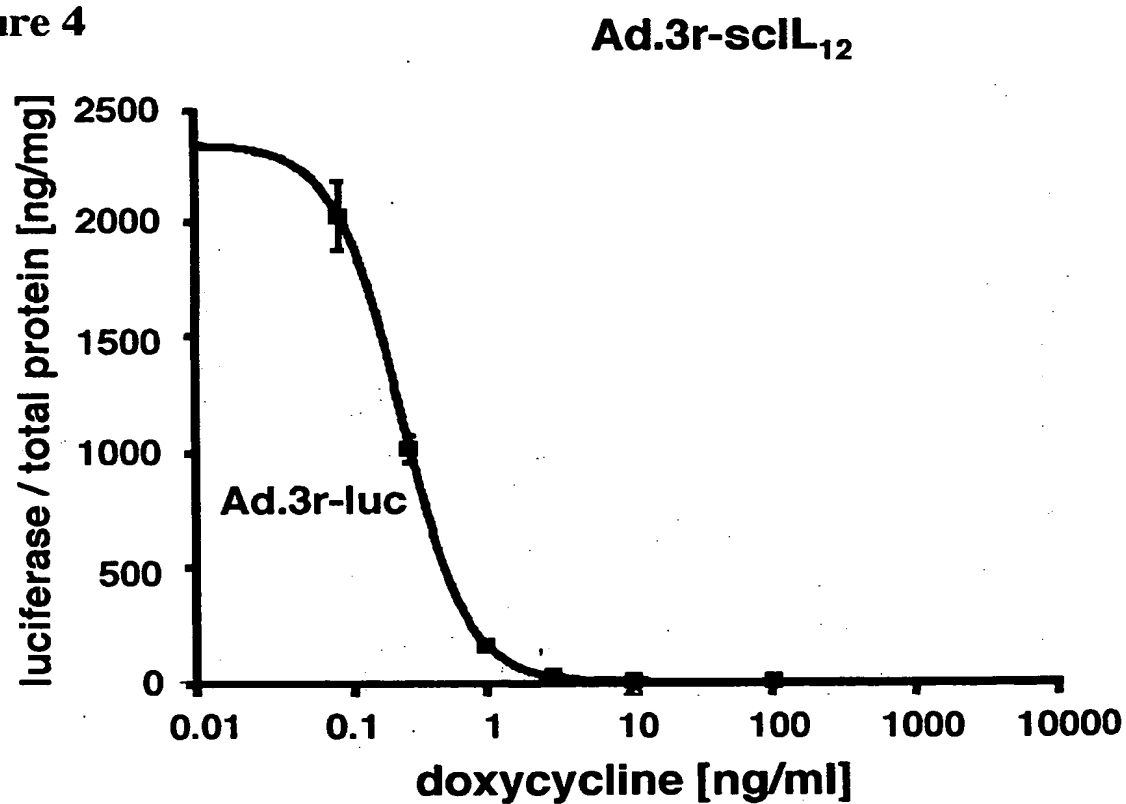


Block et al. 2002

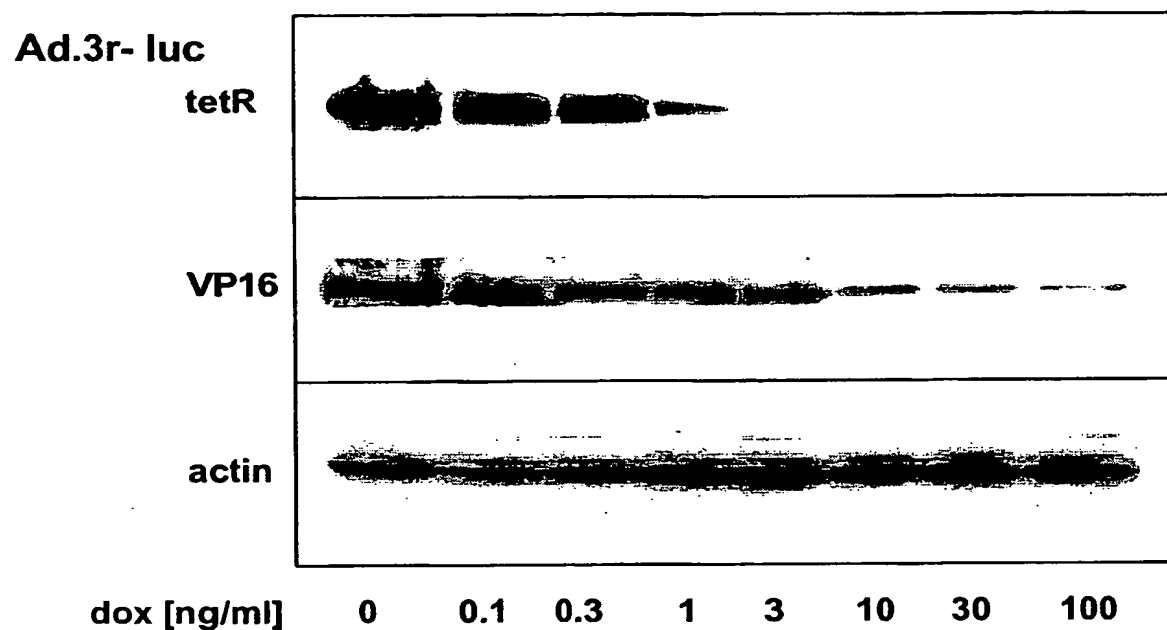
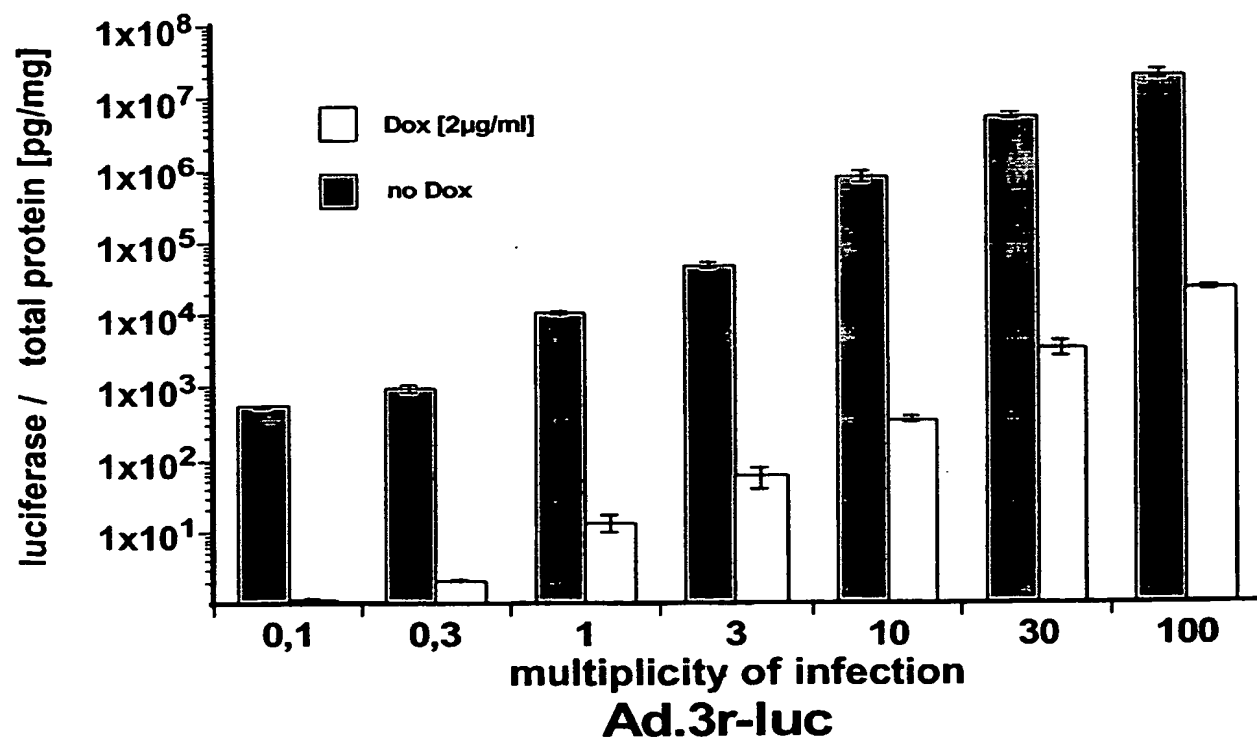
Figure 2



Block et al. 2002

Figure 3**Figure 4**

Block et al. 2002

Figure 5**Figure 6**

Block et al. 2002

Figure 7

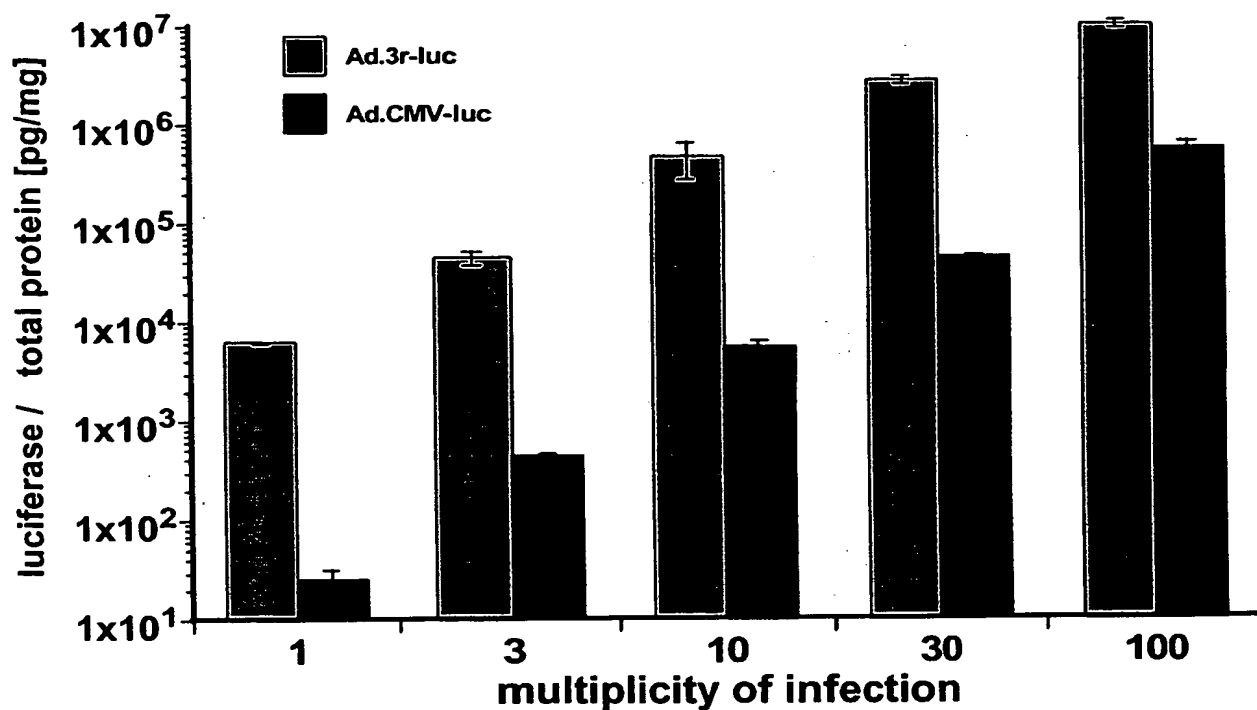
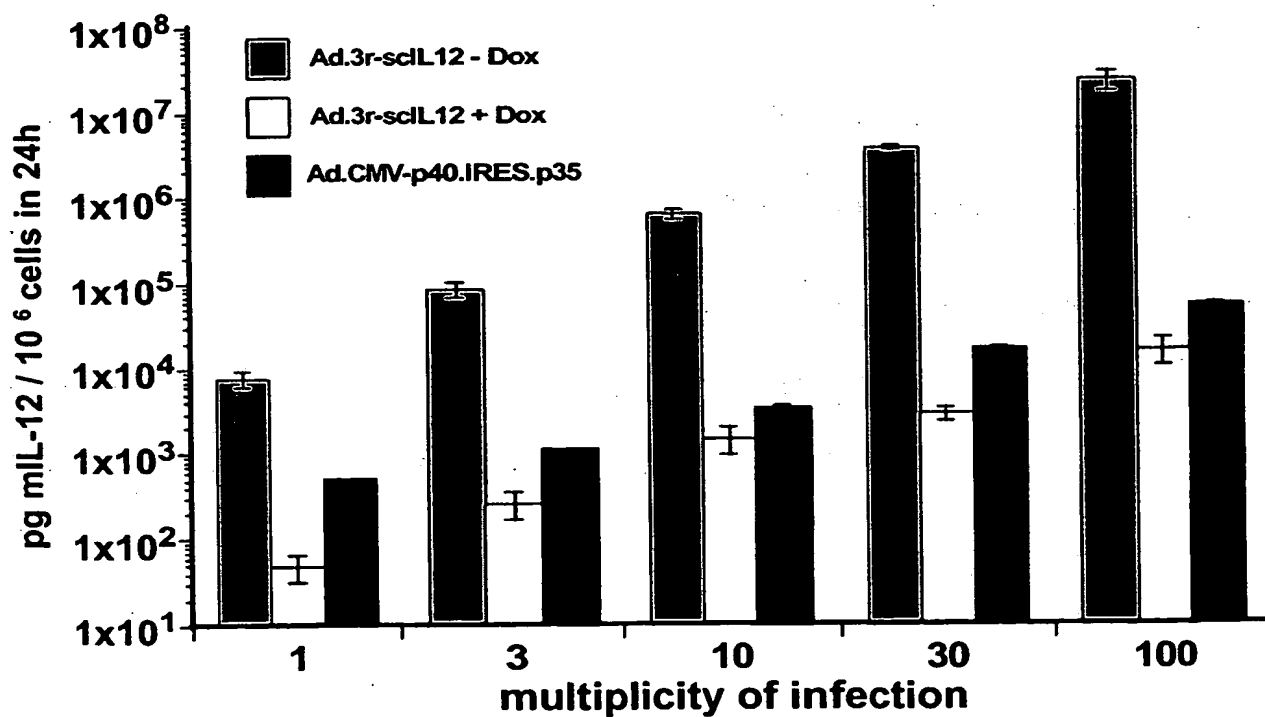


Figure 8



Block et al. 2002

Figure 9

Ad.3r-sclL12

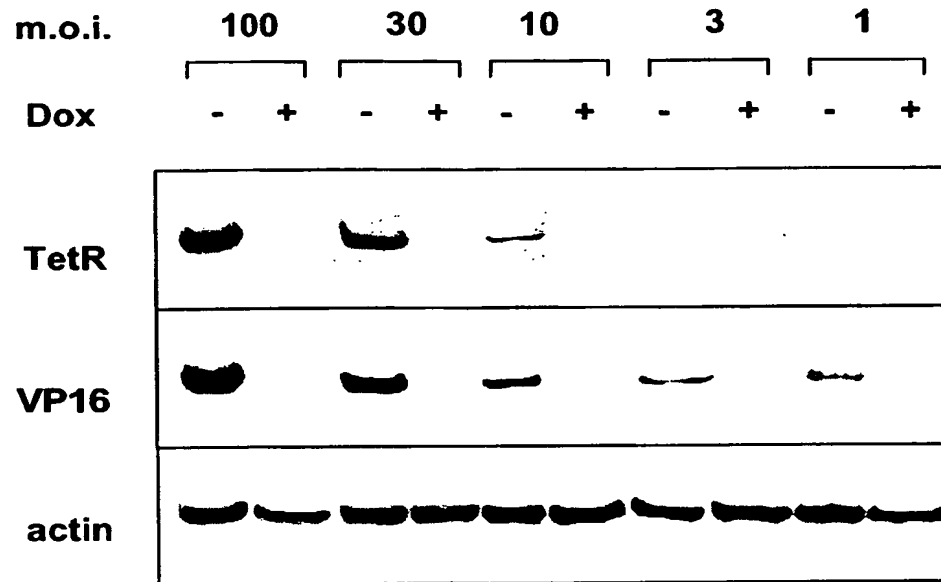
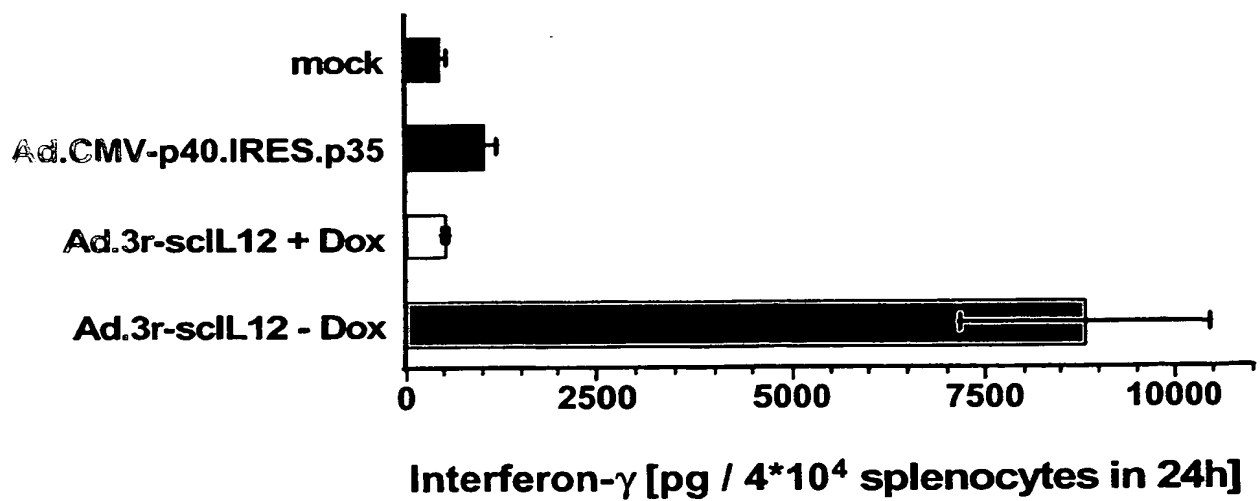
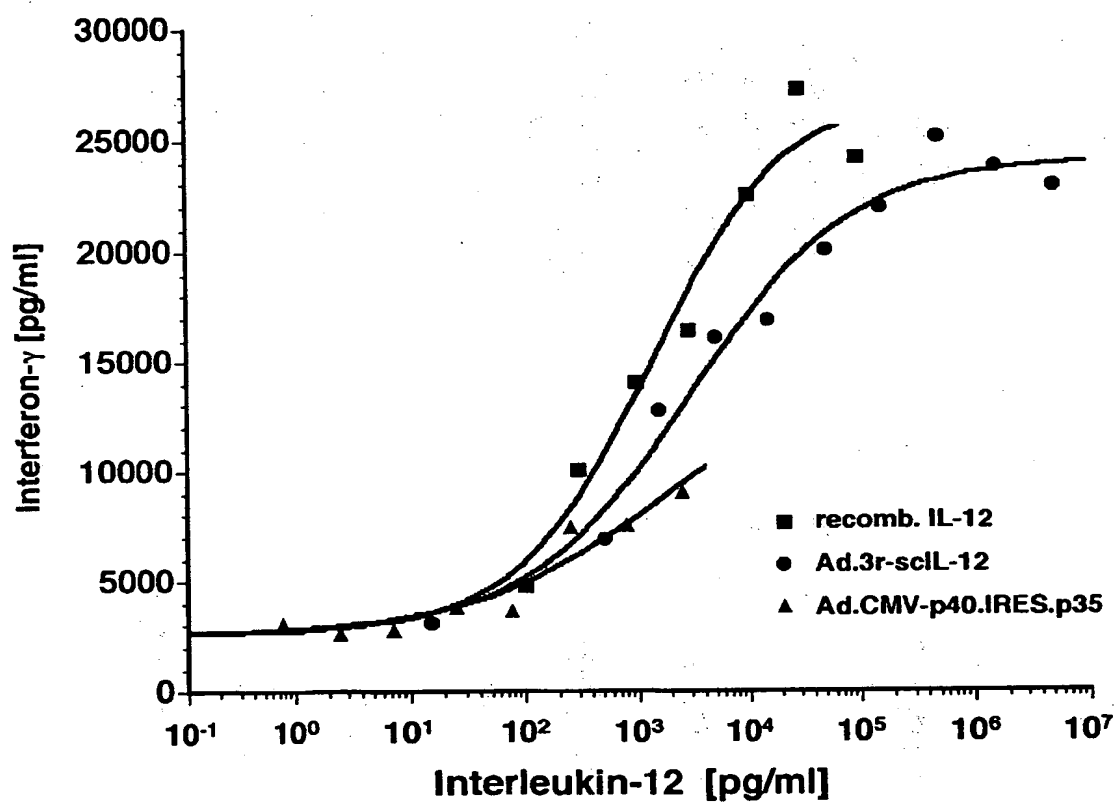


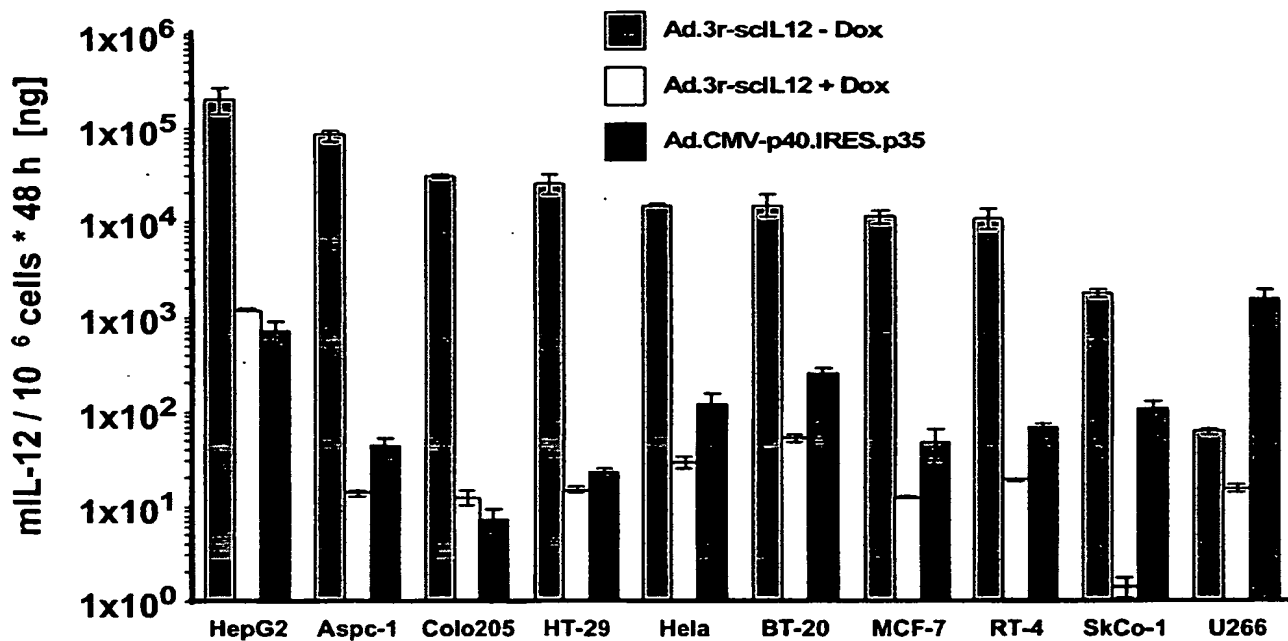
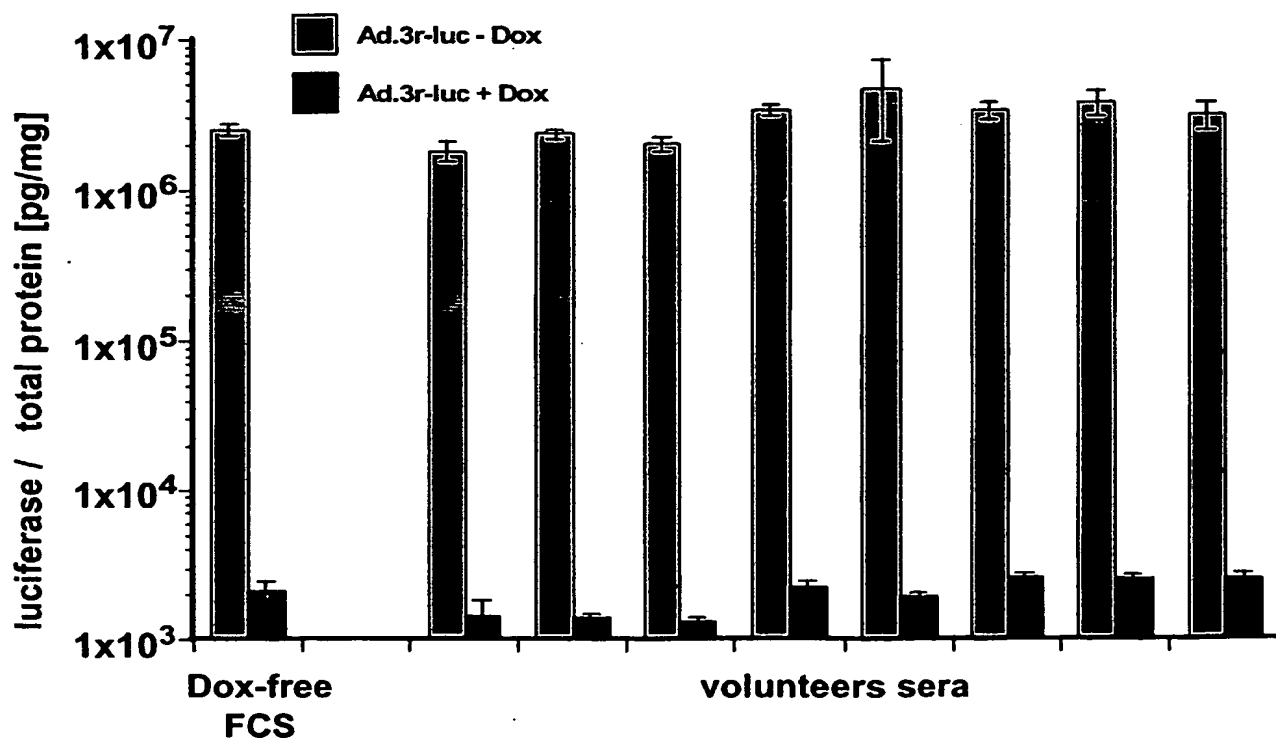
Figure 10



Block et al. 2002

Figure 11

Block et al. 2002

Figure 12**Figure 13**

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

<120> Rekombinante virale Vektoren zur Tetracyclin-regulierbaren Genexpression

<130> P 63006

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 11569

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r.hscIL-12 zur regulierten Expression des humanen IL-12

<220>

<221> gene

<222> (327)..(713)

<223> VP16

<220>

<221> gene

<222> (714)..(1352)

<223> TetR

<220>

<221> Intron

<222> (1353)..(1912)

<223>

<220>

<221> promoter

<222> (1864)..(1902)

<223> TK-min

<220>

<221> protein_bind

<222> (1913)..(2212)

<223> TetO7

<220>

<221> misc_feature

<222> (2213)..(2709)

<223> CMV-min + Intron

<220>

<221> promoter

<222> (2226)..(2264)

<223> CMV-min

<220>
 <221> gene
 <222> (2710)..(4308)
 <223> Humanes single-chain IL-12

<220>
 <221> mutation
 <222> (4020)..(4023)
 <223> T/C, A/T, G/C, T/G

<400> 1
 ctgctggttc tttccgcctc agaagccata gagcccaccg catccccagc atgcctgcta 60
 ttgtcttccc aatcctcccc cttgctgtcc tgccccaccc cccccccag aatagaatga 120
 cacctactca gacaatgcga tgcaatttcc tcattttatt aggaaaggac agtgggagtg 180
 gcaccttcca ggggtcaagga aggcacgggg gaggggcaaa caacagatgg ctggcaacta 240
 gaaggcacag tccagagctga tcagcgagct ctgacattta ggtgacacta tagaataagg 300
 cctctagga tccatcctcg cgcctccctac ccaccgtact cgtcaattcc aaggggatcg 360
 gtaaacatct gctcaaaactc gaagtcggcc atatccagag cgcctgtaggg ggcggagtcg 420
 tgggggggtaa atccccggacc cggggaatcc ccgtcccccac acatgtccag atcgaaatcg 480
 tctagcgcgt cggcatgcgc catcgccacg tcctcgcctg ctaagtggag ctcgctcccc 540
 aggtgacat cggtcggggg ggccgtggac agtctgcgcg tgtgtcccg cgggagaaag 600
 gacaggcgcg gagccgcag ccccgctctc tcgggggctg cgtcgtccgg gagatcgagc 660
 aggcctcga tggtagacc gtaattgttt ttcgtacgcg cgcggctgta cgcggaccca 720
 ctttcacatt taagtgttt ttctaaccg catatgatca attcaaggcc gaataagaag 780
 gctggctctg cacttggtg atcaaataat tcgatagctt gtcgtaataa tggcggcata 840
 ctatcagtag taggtgttt cttttctctc ttagecactt gatgctcttg atcttccaat 900
 acgcaacctc aagtaaaatg cccacacgcg ctgagtgcatt ataatgcatt ctctagtga 960
 aaaccttggt ggcataaaaa ggctaattga ttttcgagag tttcatactg tttttctgta 1020
 ggccgtgtac ctaaatgtac tttgtctcca tcgcgatgac ttagtaaaagc acatctaaaa 1080
 cttttagcgt tattacgtaa aaaatcttgc cagctttccc cttctaaagg gcaaaagtga 1140
 gtatggtgcc tatctaact ctcaatggct aaggcgctga gcaaagcccg cttatttttt 1200
 acatgccaat acaatgtagg ctgctctaca cctagcttct gggcgagttt acgggttgtt 1260
 aaaccttcga ttccgacctc attaagcagc tctaattgcg tgtaatacac ttacttttta 1320
 tctaattctag agggctctggg tctctttggc atggctgaat taattcgcgt cgagccggcc 1380
 gcggttaciaa ttccggttgg acctgggagt ggacacctgt ggagagaaaag gcaaaagtga 1440
 tgtcattgtc actcaagtgt atggccagat ctcaagcctg ccacacctca agcttgacaa 1500
 caaaaagatt gtcttttctg accagatgga cgcggccacc ctcaaaggca tcaccgcggg 1560
 ccagggtgaat atcaaatcct cctcgttttt ggaaactgac aatcttagcg cagaagtcatt 1620
 gcccgttttt gagagggagt actcacccca acagtcgaga ggttttccga tccggctcgat 1680
 gcggactcgc tcaggtccct cgggtggcggg gtaccgttcg gagggccgag ggtttccgat 1740
 ccaagagtac tggaaagacc gcgaagagtt tgtcctcaac cgcgagccca acaggcgtcg 1800
 aagcttgatg ggtcgtcgcg tgttcgaggg cacacgcgtc accttaatat gcgaagtggg 1860
 cctcggaccg cgcgcgcccg actgcatctg cgtgttcgaa ttgcccggcg agctcgactt 1920
 tcaattttct ctatcactga tagggagtgg taaactcgac ttctactttt ctctatcact 1980
 gatagggagt ggtaaaactc actttcactt ttctctatca ctgataggga gtggtaaaact 2040
 cgactttcac ttttctctat cactgatagg gagtggtaaa ctcgactttc acttttctct 2100
 atcactgata gggagtggta aactcgactt tcaattttct ctatcactga tagggagtgg 2160
 taaactcgac tttcactttt ctctatcact gatagggagt ggtaaaactc acggctcgagg 2220
 gtcgagttag cgtgtacggg gggaggccta tataagcaga gctcgttttag tgaaccgtca 2280
 gatcgctgg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagacacc gggaccgatc 2340
 cagcctccgc ggcctccgaat tgcgaagctt tattgcggta gtttatcaca gttaaattgc 2400
 taacgcagtc agtgcttctg acacaacagt ctcgaaacta agctgcagaa gttggtcgtg 2460
 aggcactggg caggtaagta tcaaggttac aagacaggtt taaggagacc aatagaaact 2520
 .gggcttgctg agacagagaa gactcttgcg tttctgatag gcacctattg gtcttactga 2580
 catccacttt gcctttctct ccacaggtgt ccactcccag ttcaattaca gctcttaagg 2640
 ctagagtact taatacgact cactataggc tagcctcgag aattcacgcg tggtagccag 2700
 ctccgatcca tgggtcacca gcagttgggt atctcttggt tttccctggg ttttctggca 2760
 tctccctcgc tggccatatg ggaactgaag aaagatgttt atgtcgtaga attggattgg 2820
 tatccggatg cccctggaga aatggtgggt ctcacctgtg acaccctga agaagatggg 2880
 atcacctgga ccttggaacca gagcagtgag gtcttaggct ctggcaaaac cctgaccatc 2940
 caagtcaaa agtttggaaga tgctggccag tacacctgtc acaaaggagg cgaggttcta 3000

agccattcgc	tectgtctgt	tcacaaaaag	gaagatggaa	tttgggtccac	tgatattttta	3060
aaggaccaga	aagaacccaa	aaataagacc	tttctaagat	gcgaggccaa	gaattatttct	3120
ggacgtttca	cctgctgggtg	gctgacgaca	atcagtactg	atttgacatt	cagtgtcaaa	3180
agcagcagag	gctcttctga	cccccaagg	gtgacgtgcg	gagctgtctac	actctctgca	3240
gagagagtca	gaggggacaa	caaggagtat	gagtactcag	tggagtgcc	ggaggacagt	3300
gcctgcccag	ctgctgagga	gagtctgccc	attgaggtca	tgggtggatgc	ggttcacaag	3360
ctcaagtatg	aaaactacac	cagcagcttc	ttcatcagg	acatcatcaa	acctgaccca	3420
cccaagaact	tgcagctgaa	gccattaaag	aattctcggc	aggtggagggt	cagctgggag	3480
tacctgaca	cctggagtac	tcacattcc	tacttctccc	tgacattctg	cgttcagggtc	3540
cagggcaaga	gcaagagaga	aaagaaagat	agagtcttca	cggacaagac	ctcagccacg	3600
gtcatctgcc	gcaaaaatgc	cagcattagc	gtgcggggccc	aggaccgcta	ctatagctca	3660
tcttgagcgc	aatgggcatc	tgtgccctgc	agtgggtggcg	gtggcggcg	atctagaaac	3720
ctccccgtgg	ccactccaga	cccaggaatg	ttcccatgcc	ttcaccactc	ccaaaacctg	3780
ctgagggccg	tcagcaacat	gctccagaag	gccagacaaa	ctctagaatt	ttacccttgc	3840
acttctgaag	agattgatca	tgaagatata	acaaaagata	aaaccagcac	agtggaggcc	3900
tgtttaccat	tgggaattac	caagaatgag	agttgcctaa	attccagaga	gacctcttcc	3960
ataactaatg	ggagttgcct	ggcctccaga	aagacctctt	ttagatggc	cctgtgcctc	4020
tcgagtattt	atgaagactc	gaagatgtac	caggtggagt	tcaagaccat	gaatgcaaa	4080
cttctgatgg	atcctaagag	gcagatcttt	ctagatcaaa	acatgctggc	agttattgat	4140
gagctgatgc	aggccctgaa	tttcaacagt	gagactgtgc	cacaaaaatc	ctcccttgaa	4200
gaaccggatt	tttataaaac	taaaatcaag	ctctgcatac	ttcttcatgc	tttcagaatt	4260
cgggcagtg	ctattgatag	agtgatgagc	tatctgaatg	cttcctaaaa	agcgaggtcg	4320
atccggatta	gtccaatttg	ttaaagacag	gatattcagt	gtccaggctc	tagttttgac	4380
tcaacaatat	caccagctga	agcctataga	gtacgagcca	tagataaaat	aaaagatttt	4440
atttagtctc	cagaaaaagg	ggggaatgaa	agacccacc	tgtaggtttg	gcaagctagt	4500
aaaggccgcc	agtgtgctgg	aattctgcag	atatccatca	cactggcggc	cgctcgagca	4560
tgcacttaga	gggccctatt	ctatagtgtc	acctaaatgc	tagagctcgc	tgatcagcct	4620
cgactgtgcc	ttctagtgtc	cagccatctg	ttgtttgccc	ctccccctg	ccttccctga	4680
ccctggaagg	tgccactccc	actgtccttt	cctaataaaa	tgaggaaatt	gcacgcatt	4740
gtctgagtag	gtgtcattct	attctggggg	gtgggggtggg	gcaggacagc	aagggggagg	4800
attgggaaga	caatagcagg	catgctgggg	atgcggtggg	ctctatggct	tctgaggcgg	4860
aaagaaccag	tcgacatcga	tgctagagtg	gaaggtgctg	aggtacgatg	agaccgcac	4920
caggtgcaga	ccctgcgagt	gtggcggtaa	acatattagg	aaccagcctg	tgatgctgga	4980
tgtgaccgag	gagctgaggc	ccgatcactt	gggtgctggc	tgcacccgcg	ctgagtttgg	5040
ctctagcgat	gaagatacag	attgaggtac	tgaatgtgt	gggcgtggct	taaggggtggg	5100
aaagaatata	taaggtgggg	gtcttatgta	gttttgatc	tgttttgag	cagccgcgc	5160
cgccatgagc	accaactcgt	ttgatggaag	cattgtgagc	tcatatttga	caacgcgc	5220
gcccccatgg	gccgggggtgc	gtcagaatgt	gatgggctcc	agcattgatg	gtcgccccgt	5280
cctgcccgc	aactctacta	ccttgaccta	cgagaccgtg	tctggaacgc	cgctggagac	5340
tgacgcctcc	gccgcgcgtt	cagccgctgc	agccaccgcc	cgcgggattg	tgactgactt	5400
tgttttctctg	agcccgcttg	caagcagtg	agcttcccgt	tcatccgccc	gcgatgacaa	5460
gttgacggct	cttttggcac	aattggattc	tttgaccggg	gaacttaatg	tcgtttctca	5520
gcagctgttg	gatctgcgcc	agcaggtttc	tgccctgaag	gcttccctcc	ctcccaatgc	5580
ggtttaaaac	ataaataaaa	aaccagactc	tgtttggatt	tggatcaagc	aagtgtcttg	5640
ctgtctttat	ttaggggttt	tgcgcgcgcg	gtaggcccgg	gaccagcggg	ctcggtcggt	5700
gagggctctg	tgtatttttt	ccaggacgtg	gtaaagggtga	ctctggatgt	tcagatacat	5760
gggcataagc	ccgtctcttg	ggtggaggta	gcaccactgc	agagcttcat	gctgcggggg	5820
ggtgtttag	atgatccagt	cgtagcagga	gcgctggg	tgggtgcctaa	aaatgtcttt	5880
cagtagcaag	ctgattgcca	ggggcaggcc	cttggtgtaa	gtgtttacaa	agcggttaag	5940
ctgggatggg	tgcatacgtg	gggatatgag	atgcactctg	gactgtattt	ttaggttggc	6000
tatgttccca	gccatatccc	tccggggatt	catgttgtgc	agaaccacca	gcacagtgt	6060
tccgggtgc	ttgggaaatt	tgtcatgtag	cttagaagga	aatgcgtgga	agaacttgg	6120
gacgccttg	tgacctcaa	gattttccat	gcattcgtcc	ataatgatgg	caatgggccc	6180
acgggcggcg	gcctgggcga	agatatttct	gggatcacta	acgtcatagt	tgtgttccag	6240
gatgagatcg	tcataggcca	tttttacaaa	gcgcggggcg	aggtggccag	actgcgggat	6300
aatgggtcca	tccggcccag	ggcgtagtt	accctcacag	atttgcattt	cccacgttt	6360
gagttcagat	gggggggatca	tgtctacctg	cggggcgatg	aagaaaacgg	tttcgggggt	6420
aggggagatc	agctgggaag	aaagcaggtt	cctgagcagc	tgcgacttac	cgcagccggg	6480
gggcccgtaa	atcacaccta	ttaccgggtg	caactggtag	ttaagagagc	tgcagctgcc	6540
gtcatccctg	agcagggggg	ccacttcgtt	aagcatgtcc	ctgactcgca	tgttttccct	6600
gaccaaattcc	gccagaaggc	gctcgccgcc	cagcgatagc	agttcttgca	aggaagcaaa	6660

gtttttcaac	ggtttgagac	cgctccgccgt	aggcatgctt	ttgagcgttt	gaccaagcag	6720
ttccaggcgg	ttccacagct	cggtcacctg	ctctacggca	tctcgatcca	gcatactctc	6780
tcgttttcg	ggttggggcg	gcttttcgctg	tacggcagta	gtcggtgctc	gtccagacgg	6840
gccagggtca	tgtctttcca	cgggcgccagg	gtcctcgctca	gcgtagtctg	ggtcacgggtg	6900
aaggggtg	ctccgggctg	cgcgctggcc	agggtgcgct	tgaggctggt	cctgctgggtg	6960
ctgaagcgct	gcccgtcttc	gcccgtgcg	tcggccagggt	agcatttgac	catggtgtca	7020
tagtccagcc	cctccgcggc	gtggcccttg	gcgcgcagct	tgcccttgga	ggaggcgccg	7080
cacgaggggc	agtgcagact	tttgaggcg	tagagcttg	gcgcgagaaa	taccgattcc	7140
ggggagtagg	catccgcgcc	gcaggcccg	cagacggctc	cgcattccac	gagccagggtg	7200
agctctggcc	gttcgggggtc	aaaaaccagg	tttcccccat	gctttttgat	gcgtttctta	7260
cctctgggtt	ccatgagccg	gtgtccacgc	tcggtgacga	aaaggctgtc	cgtgtccccg	7320
tatacagact	tgagaggcct	gtcctcgacc	gatgcccttg	agagccttca	acccagtcag	7380
ctccttcg	tgggcgcg	gcatgactat	cgctgcgcga	cttatgactg	tcttctttat	7440
catgcaactc	gtaggacagg	tgccggcagc	gctctgggtc	attttcggcg	aggaccgctt	7500
tcgctggagc	gcgacgatga	tcggcctgtc	gcttgcggtta	ttcggaatct	tgacgcctt	7560
cgctcaagcc	ttcgtcactg	gtcccggccac	caaacgtttc	ggcgagaagc	aggccattat	7620
cgccggcatg	gcggccgacg	cgctgggcta	cgtcttgctg	gcgttcgcga	cgcgaggctg	7680
gatggccttc	cccattatga	ttcttctcgc	ttccggcgcc	atcgggatgc	ccgcgttgca	7740
ggccatgctg	tccaggcagg	tagatgacga	ccatcaggga	cagcttcaag	gatcgctcgc	7800
ggctcttacc	agcctaactt	cgatcactgg	accgctgac	gtcacggcga	tttatgcgc	7860
ctcggcgagc	acatggaacg	ggttggcatg	gattgtaggg	gccgccctat	accttgtctg	7920
cctccccg	ttgcgtcg	gtgcatggag	ccgggccacc	tcgacctgaa	tggaagccgg	7980
cggcacctcg	ctaacggatt	caccactcca	agaattggag	ccaatcaatt	cttgccgaga	8040
actgtgaatg	cgcaaacc	cccttggcag	aacatacca	tcgcgtccgc	catctccagc	8100
agccgcacgc	ggcgcatctc	gggcagcggt	gggtcctggc	cacgggtg	catgatcg	8160
ctcctgtcgt	tgaggacc	gctaggctgg	cggggttgcc	ttactgggtta	gcagaatgaa	8220
tcaccgatac	gcgagcgaa	gtgaagcgac	tgctgctgca	aaacgtctgc	gacctgagca	8280
acaacatgaa	tggtcttcg	tttcgctggt	tcgtaaagtc	tggaacgcg	gaagtcagcg	8340
ccctgcacca	ttatgttcg	gatctgcac	gcaggatgct	gctggctacc	ctgtggaaca	8400
cctacatctg	tattaacgaa	gcgctggcat	tgacctgag	tgatttttct	ctgggtccgc	8460
cgcacccata	ccgccagttg	tttaccctca	caacgttcca	gtaaccgggc	atgttcatca	8520
tcagtaaccc	gtatcgtgag	catcctctct	cgtttcatcg	gtatcattac	ccccatgaac	8580
agaaattccc	ccttacacgg	aggcatcaag	tgaccaaaca	ggaaaaaacc	gcccttaaca	8640
tggcccgcctt	tatcagaagc	cagacattaa	gccttctgga	gaaactcaac	gagctggacg	8700
cggatgaaca	ggcagacatc	tgtgaatcgc	ttcacgacca	cgctgatgag	ctttaccgca	8760
gctgcctcgc	gcgtttcggt	gatgacgggtg	aaaacctctg	acacatgcag	ctcccggaga	8820
cggtcacagc	ttgtctgtaa	gcggatgccg	ggagcagaca	agcccgtcag	ggcgcgctcag	8880
cgggtgttgg	cgggtgtcgg	ggcgagcca	tgacctagtc	acgtagcgat	agcggagtgt	8940
atactggctt	aactatgcgg	catcagagca	gattgtactg	agagtgcacc	atatgcgggtg	9000
tgaaataccg	cacagatgcg	taaggagaaa	ataccgcac	aggcgctctt	ccgcttctc	9060
gctcactgac	tcgctgcgct	cggtcggttcg	gctgcggcga	cggttatcag	ctcactcaaa	9120
ggcggttaata	cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	9180
aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	ctggcggtttt	tccataggct	9240
ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagaggtggc	gaaacccgac	9300
aggactataa	agataaccagg	cgtttcccc	tggaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	9360
gaccctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	9420
tcaatgctca	cgctgtaggt	atctcagttc	ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	9480
tgtgcacgaa	cccccggttc	agccccgaccg	ctgcgcctta	tccggtaact	atcgtcttga	9540
gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	gccactggta	acaggattag	9600
cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	tggtggccta	actacggcta	9660
cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	9720
agttggtagc	ctttgatccg	gcaaacaac	caccgctggt	agcgggtggtt	tttttgtttg	9780
caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	atctcaagaa	gaccccttga	tcttttctac	9840
ggggtctgac	gctcagtggg	acgaaaactc	acgttaagg	attttgggtca	tgagattatc	9900
aaaaaggatc	ttcacctaga	tcctttttaa	ttaaaaatga	agttttaaat	caatctaaag	9960
tatatatgag	taaacttggt	ctgacagtta	ccaatgctta	atcagtggag	cacctatctc	10020
agcgatctgt	ctatttcggt	catccatagt	tgccctgaactc	cccgtcgtgt	agataactac	10080
gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	ataccgcgag	acccagctc	10140
accggctcca	gatttatcag	caataaacca	gccagccgga	agggccgagc	gcagaagtgg	10200
tcttgaact	ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	10260
tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	tggttgccatt	gctgcaggca	tcgtgggtgc	10320

```

acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctcgggttcc caacgatcaa ggcgagttac 10380
atgatccccc atgttggtgca aaaaagcggg tagctccttc ggctcctccga tcgttggtcag 10440
aagtaagttg gccgcagtggt tatcactcat gggtatggca gcactgcata attctcttac 10500
tgtcatgcca tccgtaagat gctttttctgt gactgggtgag tactcaacca agtcattctg 10560
agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaacacggg ataataccgc 10620
gccacatagc agaactttta aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact 10680
ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg 10740
atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaaacag gaaggcaaaa 10800
tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt 10860
tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggatata tatttgaatg 10920
tatttagaaa aataaacaata taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga 10980
cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc 11040
ctttcgtctt caagaattct tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg 11100
ccctttcgtc atcatcaata atatacctta ttttggattg aagccaatat gataatgagg 11160
gggtggagtt tgtgacgtgg cgcgggcggt gggaaacggg cggtgacgt agtagtgtgg 11220
cggaagtgtg atgttgcaag tgtggcgga cecatgtaag cgccggatgt ggtaaaagtg 11280
acgttttttg tgtgcgccgg tgtatacggg aagtgacaat ttccgcgcgg ttttaggcgg 11340
atgttgtagt aaatttgggc gtaaccaagt aatgtttggc cattttcgcg ggaaaactga 11400
ataagaggaa gtgaaatctg aataattctg tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag 11460
ggcgcggggg actttgaccg tttacgtgga gactcgccca ggtgtttttc tcaggtgttt 11520
tccgcgttcc ggggtcaaagt tggcgtttta ttattatagt cagctctag 11569

```

<210> 2

<211> 11458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r.mscIL-12 zur regulierten Expression des murinen IL-12

<220>

<221> gene

<222> (327) .. (713)

<223> VP16

<220>

<221> gene

<222> (714) .. (1352)

<223> TetR

<220>

<221> Intron

<222> (1353) .. (1912)

<223>

<220>

<221> promoter

<222> (1864) .. (1902)

<223> TK-min

<220>

<221> protein_bind

<222> (1913) .. (2212)

<223> TetO7

<220>

<221> misc_feature

<222> (2213)..(2687)
<223> CMV-min + Intron

<220>
<221> promoter
<222> (2226)..(2264)
<223> CMV-min

<220>
<221> gene
<222> (2688)..(4325)
<223> Murines single-chain IL-12

<400> 2
ctgctgggttc tttccgcctc agaagccata gagcccaccg catccccagc atgcctgcta 60
ttgtcttccc aatcctcccc cttgctgtcc tgccccaccc cccccccagc aatagaatga 120
cacctactca gacaatgcga tgcaatttcc tcattttatt aggaaaggac agtgggagtg 180
gcaccttcca ggggtcaagga aggcacgggg gaggggcaaa caacagatgg ctggcaacta 240
gaaggcacag tcgaggtga tcagcgagct ctagcattta ggtgacacta tagaataggg 300
ccctctagga tcgacctcgc cgccccctac ccaccgtact cgtcaattcc aagggcatcg 360
gtaaaccatct gctcaaactc gaagtcggcc atatccagag cgccgtaggg ggcggagtcg 420
tggggggtaa atcccggaacc cggggaatcc ccgtcccca acatgtccag atcgaaatcg 480
tctagcgcgt cggcatgcgc catcgccacg tctcgcctgt ctaagtggag ctcgtcccc 540
aggctgacat cggtcggggg ggccgtggac agtctgcgcg tgtgtcccg cgtcgcccg 600
gacaggcgcg gagccgacg ccccgctctc tcgggggcgt cgtcgcccg gagatcgagc 660
aggccctcga tggtagaccc gtaattgttt ttcgtacgcg cgcggctgta cgcggaccca 720
ctttcacatt taagtgtttt ttctaactcg catatgatca attcaaggcc gaataagaag 780
gctggctctg caccttggtg atcaaataat tcgatagctt gtcgtaataa tggcggcata 840
ctatcagtag taggtgtttc cttttcttct ttagcgactt gatgctcttg atcttccaat 900
acgcaacctc aagtaaaatg cccacagcg ctgagtgcatt ataatgcatt ctctagtga 960
aaaccttggt ggcataaaaa ggctaattga ttttcgagag tttcatactg tttttctgta 1020
ggcgtgttac ctaaagtac ttttgctcca tcgcatgac ttagtaaaag acatctaaaa 1080
cttttagcgt tattacgtaa aaaatcttgc cagctttccc cttctaaagg gcaaaagtga 1140
gtatggtgcc tatctaaccat ctcaatggct aaggcgtcga gcaaagcccc cttatttttt 1200
aaaccttcga ttccgacctc attaaagcgc tctaattgcg tgtaatacac tttactttta 1320
tctaattctag agggctctggg tctctttggc atggtcgaat taattcgcgt cgagccggcc 1380
gcggtgtacaa ttccggttg acctgggagt ggacacctgt ggagagaaag gcaaaagtga 1440
tgtcattgtc actcaagtgt atggccagat ctcaagcctg ccacacctca agcttgacaa 1500
caaaaagatt gtcttttctg accagatgga cgcggccacc ctcaaaggca tcaccgcggg 1560
ccaggtgaat atcaaatect cctcgttttt ggaactgac aatcttagcg cagaagtcac 1620
gcccgttttt gagagggagt actcaccoca acagtcgaga ggttttccga tccggtcgat 1680
gcgactcgc tcaggtccct cgggtggcgga gtaccgttcg gagggcgacg ggtttccgat 1740
ccaagagtac tggaaagacc gcgaagagtt tgtcctcaac cgcgagccca acaggcgtcg 1800
aagcttgatg ggtcgctcgg tgttcgaggc cacacgcgtc acctaatat gcgaagtga 1860
cctcggaccg cgccgccccg actgcatctg cgtgttcgaa ttgcccggcg agctcgactt 1920
tactttttct ctatcactga tagggagtgg taaactcgac tttcactttt ctctatcact 1980
gatagggagt ggtaaactcg actttcactt ttctctatca ctgataggga gtggtaaact 2040
cgactttcac ttttctctat cactgatagg gacttttct ctatcactga tagggagtgg 2100
atcactgata gggagtggta aactcgactt tctatcactg ctatcactga tagggagtgg 2160
taaactcgac tttcactttt ctctatcact gataggaggt ggtaaactcg acggtcgagg 2220
gtcagtagtg cgtgtacggg gggaggccta tataagcaga gctcgttttag tgaaccgtca 2280
gatcgccctg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagacacc gggaccgatc 2340
cagcctccgc ggccccgaat tgcgaagctt tattgcggta gtttatcaca gttaaattgc 2400
taacgcagtc agtgcttctg acacaacagt ctggaactta agctgcagaa gttggtcgtg 2460
aggcactggg caggtaagta tcaaggttac aagacaggtt taaggagacc aatagaaact 2520
gggcttgctg agacagagaa gactcttgcg tttctgatag gcacctattg gtcttactga 2580
catccacttt gcctttctct ccacaggtgt ccactcccag ttcaattaca gctcttaagg 2640
ctagagtact taatacgact cactataggg tagcctcgag aattcgaatg gccatgggtc 2700
ctcagaagct aaccatctcc tggtttgcca tcgttttgcg ggtgtctcca ctcatggcca 2760
tgtgggagct ggagaaagac gtttatgttg tagagggtga ctggactccc gatgccctg 2820

gagaaacagt	gaacctcacc	tgtgacacgc	ctgaagaaga	tgacatcacc	tggacctcag	2880
accagagaca	tggagtcata	ggctctggaa	agaccctgac	catcactgtc	aaagagtttc	2940
tagatgctgg	ccagtacacc	tgccacaaaag	gaggcgagac	tctgagccac	tcacatctgc	3000
tgctccacaa	gaaggaaaat	ggaatattggt	ccactgaaat	tttaaaaaat	ttcaaaaaca	3060
agactttcct	gaagtgtgaa	gcaccaaatt	actccggacg	gttcacgtgc	tcatggctgg	3120
tgcaaagaaa	catggacttg	aagttcaaca	tcaagagcag	tagcagttcc	cctgactctc	3180
gggcagtgac	atgtggaatg	gcgtctctgt	ctgcagagaa	ggtcacactg	gaccaaaagg	3240
actatgagaa	gtattcagtg	tccctgccag	aggatgtcac	ctgcccact	gccgaggaga	3300
ccctgcccac	tgaactggcg	ttggaagcac	ggcagcagaa	taaataatgag	aactacagca	3360
ccagcttctt	catcagggac	atcatcaaac	cagaccgcgc	caagaacttg	cagatgaagc	3420
ctttgaagaa	ctcacagggtg	gaggtcagct	gggagtaccc	tgactcctgg	agcactcccc	3480
attcctactt	ctccctcaag	ttctttgttc	gaatccagcg	caagaaagaa	aagatgaagg	3540
agacagagga	ggggtgtaac	cagaaagggtg	cgttcctcgt	agagaagaca	tctaccgaag	3600
tccaatgcaa	aggcggaat	gtctgcgtgc	aagctcagga	tcgctattac	aattcctcat	3660
gcagcaagtg	ggcatgtgtt	ccctgcaggg	tccgatccgg	tggcgggtggc	tcgggcgggtg	3720
gtgggtcggg	tggcggcgga	tctagggtca	ttccagtctc	tggacctgcc	aggtgtctta	3780
gccagtcccc	aaacctgctg	aagaccacag	atgacatggg	gaagacggcc	agagaaaaac	3840
tgaacacata	ttcctgcact	gctgaagaca	tcgatcatga	agacatcaca	cgggacccaa	3900
ccagcacatt	gaagacctgt	ttaccactgg	aactacacaa	gaacgagagt	tgcttggtta	3960
ctagagagac	ttcttcacac	acaagaggga	gctgcctgcc	cccacagaag	acgtctttga	4020
tgatgaccct	gtgccttggg	agcatctatg	aggacttgaa	gatgtaccag	acagagttcc	4080
aggccatcaa	cgcagcactt	cagaatcaca	accatcagca	gatcattcta	gacaagggca	4140
tgctggtggc	catcgatgag	ctgatgcagt	ctctgaatca	taatggcgag	actctgcgcc	4200
agaaacctcc	tgtgggagaa	gcagaccctt	acagagtga	aatgaagctc	tgcatcctgc	4260
ttcacgcctt	cagcaccgcg	gtcgtgacca	tcaacagggt	gatgggctat	ctgagctccg	4320
cctgagaatt	gatccggatt	agtccaattt	gttaaagaca	ggatgggccc	tatatatgga	4380
tccactagta	acggccgcca	gtgtgctgga	attctgcaga	tatccatcac	actggcgccc	4440
gctcgagcat	gcacttagag	ggccctattc	tatagtgtca	cctaaatgct	agagctcgct	4500
gatcagcctc	gactgtgcct	tctagttgcc	agccatctgt	tgtttgcccc	ttccccgtgc	4560
cttccttgac	cctggaagg	gccactccca	ctgtcctttc	ctaataaaat	gaggaaattg	4620
catcgcat	tctgagtagg	tgctcattcta	ttctgggggg	tgggggtggg	caggacagca	4680
agggggagga	ttgggaagac	aatagcagge	atgctgggga	tgcggtgggc	tctatggctt	4740
ctgaggcgga	aagaaccagt	cgacatcgat	tctagagtgg	aagggtgctga	ggtagcatga	4800
gaccgcgacc	aggtgcagac	cctgcgagtg	tggcggtaaa	catattagga	accagcctgt	4860
gatgctggat	gtgaccgagg	agctgaggcc	cgatcacttg	gtgctggcct	gcaccgcgcg	4920
tgagtttggc	tctagcgatg	aagatacaga	ttgaggtact	gaaatgtgtg	ggcgtggcct	4980
aagggtggga	aagaatatat	aagggtgggg	tcttatgtag	ttttgtatct	gttttgacgc	5040
agccgcgcgc	gccatgagca	ccaactcggt	tgatggaagc	attgtgagct	catatttgac	5100
aacgcgcgat	cccccatggg	ccgggggtgcg	tcagaatgtg	atgggctcca	gcattgatgg	5160
tcgccccgct	ctgcccgcga	actctactac	cttgacctac	gagaccgtgt	ctggaacgcc	5220
gttgagagact	gcagcctccg	ccgcgcgttc	agccgctgca	gccaccgccc	gcgggattgt	5280
gactgacttt	gctttcctga	gcccgccttg	aagcagtga	gcttcccggt	catccgcccc	5340
cgatgacaag	ttgacggctc	ttttggcaca	attggattct	ttgaccgggg	aacttaattgt	5400
cgtttctcag	cagctgttgg	atctgcgcca	gcaggtttct	gccctgaagg	cttcctcccc	5460
tccaatgcg	gtttaaaaca	taaataaaaa	accagactct	gtttggattt	ggatcaagca	5520
agtgtcttgc	tgtctttatt	taggggtttt	gcgcgcgcgc	tagggccggg	accagcggtc	5580
tcggctcggtg	agggtcctgt	gtattttttc	caggacgtgg	taaagggtgac	tctggatggt	5640
cagatacatg	ggcataagcc	cgtctctggg	gtggaggtag	caccactgca	gagcttcacg	5700
ctgcgggggtg	gtgttgtaga	tgatccagtc	gtagcaggag	cgctgggcgt	gtgcctaaa	5760
aatgtctttc	agtagcaagc	tgattgccag	gggcaggccc	ttgggtgaag	tgtttataaa	5820
gcgggttaagc	tgggatgggt	gcatacgtgg	ggatatgaga	tgcatcttgg	actgtatttt	5880
taggttggct	atgttcccag	ccatatccct	ccggggattc	atgttgtgca	gaaccaccag	5940
cacagtgtat	ccggtgcact	tgggaaattt	gtcatgtagc	ttagaaggaa	atgctgggaa	6000
gaacttggag	acgcccttgt	gacctccaag	attttccatg	cattcgctcca	taatgatggc	6060
aatgggccc	cgggcggcgg	cctgggcgaa	gatattttctg	ggatcactaa	cgctcatagtt	6120
gtgttccagg	atgagatcgt	cataggccat	ttttacaaa	cgcgggcgga	gggtgccaga	6180
ctgcgggtata	atggttccat	ccggcccagg	ggcgtagtta	ccctcacaga	tttgcatctt	6240
ccacgctttg	agttcagatg	gggggatcat	gtctacctgc	ggggcgatga	agaaaacggg	6300
ttccggggta	ggggagatca	gctgggaaga	aagcaggttc	ctgagcagct	gcgacttacc	6360
gcagccgggtg	ggcccgtaaa	tcacacctat	taccgggtgc	aactggtagt	taagagagct	6420
gcagctgcgc	tcacacctga	gcaggggggc	cacttcgtta	agcatgtccc	tgactcgcat	6480

gttttccctg	accaaataccg	ccagaaggcg	ctcgccgccc	agcgatagca	gttcttgcaa	6540
ggagqcaaag	tttttcaacg	gtttgagacc	gtccgcgcta	ggcatgcttt	tgagcgtttg	6600
accaagcagt	tccaggcggt	cccacagctc	ggtcacctgc	tctacggcat	ctcgatccag	6660
catactctct	cgtttcgcgg	gttggggcgg	ctttcgctgt	acggcagtag	tcgggtgctcg	6720
tccagacggg	ccagggtcat	gtctttccac	gggcgcaggg	tcttcgtcag	cgtagtctgg	6780
gtacagggtga	aggggtgcgc	tccgggctgc	gcgctggcca	gggtgcgctt	gaggtcggtc	6840
ctggtgggtgc	tgaagcgctg	ccggtcttcg	ccctgcgcgt	cggccaggta	gcatttgacc	6900
atgggtgtcat	agtcacagccc	ctccgcggcg	tggcccttgg	cgcgcagctt	gcccttggag	6960
gaggcgccgc	acgaggggca	gtgcagactt	ttgaggcggt	agagcttggg	cgcgagaaat	7020
accgattccg	gggagtaggc	atccgcgccc	caggccccgc	agacggcttc	gcattccacg	7080
agccagggtga	gctctggccg	ttcgggggtca	aaaaccagggt	ttcccccatg	ctttttgatg	7140
cgtttctttac	ctctgggtttc	catgagccgg	tgccacgct	cggtgacgaa	aaggctgtcc	7200
gtgtcccccgt	atacagactt	gagaggcctg	tccctcgaccg	atgcccttga	gagccttcaa	7260
cccagtcagc	tccctccggt	gggcgcgggg	catgactatc	gtcgcgcgac	ttatgactgt	7320
cttcttttate	atgcaactcg	taggacaggt	gccggcagcg	ctctgggtca	ttttcggcga	7380
ggaccgcttt	cgctggagcg	cgacgatgat	cggcctgtcg	cttgcggtat	tcggaatctt	7440
gcacgccttc	gctcaagcct	tgcctactgg	tcccgccacc	aaacgtttcg	gcgagaagca	7500
ggccattatc	gccggcatgg	cggcgacgc	gctgggctac	gtcttgctgg	cgttcgcgac	7560
gcgaggctgg	atggccttcc	ccattatgat	tcttctcgct	tccggcgcca	tcgggatgcc	7620
cgcgttgtag	gccatgctgt	ccaggcaggt	agatgacgac	catcaggggac	agcttcaagg	7680
atcgctcgcg	gctcttacca	gcctaacttc	gatcactgga	ccgctgatcg	tcacggcgat	7740
ttatgcgcgc	tcggcgagca	catggaacgg	gttggcatgg	attgtaggcg	ccgcctata	7800
ccttgtctgc	ctccccgcgt	tgctgcgcgg	tgcatggagc	cgggccacct	cgacctgaat	7860
ggaagccggc	ggcacctcgc	taacggatcc	accactccaa	gaattggagc	caatcaattc	7920
ttgcgagaaa	ctgtgaatgc	gcaaaccaac	ccttggcaga	acatatccat	cgcgtccgcc	7980
atctccagca	gccgcacgcg	gcgcatctcg	ggcagcgctg	ggctctggcc	acgggtgcgc	8040
atgatcgctg	tccgtcgctt	gaggaccggg	ctaggctggc	gggggttgct	tactggttag	8100
cagaatgaat	caccgatacg	cgagcgaacg	tgaagcgact	gctgctgcaa	aacgtctgcg	8160
acctgagcaa	caacatgaat	ggtcttcggg	ttccgtgttt	cgtaaagtct	ggaaacgcgg	8220
aagtcagcgc	cctgcaccat	tatgttccgg	atctgcatcg	caggatgctg	ctgggtaccc	8280
tgtggaacac	ctacatctgt	attaacgaag	cgctggcatt	gacctgagt	gattttttctc	8340
tggtcccgcc	gcateccatac	cgccagttgt	ttaccctcac	aacgttccag	taaccgggca	8400
tgttcatcat	cagtaacccg	tatcgtgagc	atcctctctc	gtttcatcgg	tatcatcacc	8460
cccatgaaca	gaaattcccc	cttacacgga	ggcatcaagt	gaccaaacag	gaaaaaacgg	8520
cccttaacat	ggcccgcttt	atcagaagcc	agacattaac	gcttctggag	aaactcaacg	8580
agctggacgc	ggatgaacag	gcagacatct	gtgaatcgct	tcacgaccac	gctgatgagc	8640
tttaccgcag	ctgcctcgcg	cgtttcgggtg	atgacgggtga	aaacctctga	cacatgcagc	8700
tcccgagagac	ggtcacagct	tgtctgtaag	cggatgccgg	gagcagacaa	gcccgtcagg	8760
gcgcgtcagc	gggtgttggc	gggtgtcggg	gcgcagccat	gacccagtc	cgtagcgata	8820
gcggagtgt	tactggctta	actatgcggc	atcagagcag	attgtactga	gagtgcacca	8880
tatgcgggtgt	gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaaa	taccgcatca	ggcgctcttc	8940
cgcttcctcg	ctcactgact	cgctgcgctc	ggtcgctcgg	ctgcggcgag	cgggtatcagc	9000
tactcaaaa	gcggtaatatc	ggttatccac	agaatcaggg	gataacgcag	gaaagaacat	9060
gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcgttgc	tggcgttttt	9120
ccataggctc	cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	agagggtggcg	9180
aaacccgaca	ggactataaa	gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	tcgtgcgctc	9240
tcctgttccg	accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccctt	cgggaagcgt	9300
ggcgctttct	caatgctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggtcg	ttcgctccaa	9360
gctgggctgt	gtgcacgaac	cccccggttca	gcccagccgc	tgcgccttat	ccggttaacta	9420
tcgtcttgag	tccaacccgg	taagacacga	cttatcgcca	ctggcagcag	ccactggtaa	9480
caggattagc	agagcgagggt	atgtaggcgg	tgctacagag	ttcttgaagt	ggtggcctaa	9540
ctacggctac	actagaagga	cagtatttgg	tatctgcgct	ctgctgaagc	cagttacctt	9600
cggaaaaaga	tttggtagct	cttgatccgg	caaacaaacc	accgctggta	gcggtgggtt	9660
ttttgtttgc	aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	tctcaagaag	atcctttgat	9720
cttttctacg	gggtctgacg	ctcagtggaa	cgaaaactca	cgttaaggga	ttttggcat	9780
gagattatca	aaaaggatct	tcacctagat	cctttttaat	taaaaatgaa	gttttaaatc	9840
aatctaaagt	atatatgagt	aaacttggte	tgacagttac	caatgcttaa	tcagtgggc	9900
acctatctca	gcgatctgtc	tatttctgtt	atccatagtt	gcctgactcc	ccgtcgtgta	9960
gataactacg	atacgggagg	gcttaccatc	tggccccagt	gctgcaatga	taccgcgaga	10020
cccacgctca	ccggtccag	atttatcagc	aataaaccag	ccagccggaa	gggcccagcg	10080
cagaagtgggt	cctgcaactt	tatccgcctc	catccagttc	attaattgtt	gccgggaagc	10140

```

tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctgcaggcat 10200
cgtgggtgtca cgctcgctcg ttggtatggc ttcatccagc tccgggtccc aacgatcaag 10260
gcgagttaca tgatcccccga tgttggtgcaa aaaagcggtt agctccttcg gtccctccgat 10320
cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtggt atcactcatg gttatggcag cactgcataa 10380
ttctcttact gtcattgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa 10440
gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caacacggga 10500
taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg 10560
gcgaaaactc tcaaggatct taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc 10620
acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcggt tctgggtgag caaaaacagg 10680
aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact 10740
cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat 10800
at ttgaaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt 10860
gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat 10920
cacgaggccc tttcgtcttc aagaattctt atcatgacat taacctataa aaataggcgt 10980
atcacgaggc cttttcgtca tcatcaataa tataccttat tttggattga agccaatatg 11040
ataatgaggg ggtggagttt gtgacgtggc gcggggcggtg ggaacggggc gggtgacgta 11100
gtagtgtggc ggaagtgtga tgttgcaagt gtggcggaac acatgtaagc gccggatgtg 11160
gtaaaagtga cgtttttggt gtgcgcccgt gtatacggga agtgacaatt ttcgcgcggg 11220
tttaggcgga tgttgtagta aatttgggcg taaccaagta atgtttggcc attttcgcgg 11280
gaaaactgaa taagaggaag tgaaatctga ataattctgt gttactcata gcgcgtaata 11340
tttgtctagg gccgcgggga ctttgaccgt ttacgtggag actcgcccag gtgtttttct 11400
caggtgtttt ccgcgttccg ggtcaaagtt ggcgttttat tattatagtc agctctag 11458

```

```

<210> 3
<211> 11453
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Adenovirales Expressionsplasmid pShuttle.3r.hscIL-12 zur
regulierten Expression des humanen IL-12 nach Virusgeneration
mittels AdEasy

```

```

<220>
<221> gene
<222> (327) .. (713)
<223> VP16

```

```

<220>
<221> gene
<222> (714) .. (1352)
<223> TetR

```

```

<220>
<221> Intron
<222> (1353) .. (1912)
<223>

```

```

<220>
<221> promoter
<222> (1864) .. (1902)
<223> TK-min

```

```

<220>
<221> protein_bind
<222> (1913) .. (2212)
<223> TetO7

```

```

<220>
<221> misc_feature

```

10/20

<222> (2213)..(2709)
<223> CMV-min + Intron

<220>
<221> promoter
<222> (2226)..(2264)
<223> CMV-min
<220>
<221> gene
<222> (2710)..(4308)
<223> Humanes singe-chain IL-12

<220>
<221> mutation
<222> (4020)..(4023)
<223> T/C, A/T, G/C, T/G

<400> 3
ctgctggttc tttccgcctc agaagccata gageccaccg catccccagc atgcttgcta 60
ttgtcttccc aatcctcccc cttgctgtcc tgccccaccc cccccccagc aatagaatga 120
cacctactca gacaatgcga tgcaatttcc tcatttttatt aggaaaggac agtgggagtg 180
gcaccttcca ggggtcaaggga aggcacgggg gagggggcaaa caacagatgg ctggcaacta 240
gaaggcacag tgcaggctga tcagcgagct ctagcattta ggtgacacta tagaataggg 300
ccctctagga tgcgtcctcg cgccccctac ccaccgtact cgtcaattcc aagggcacgc 360
gtaaacatct gctcaaaactc gaagtcggcc atatccagag cgccgtaggg ggcggagtcg 420
tggggggtaa atccccgacc cggggaatcc ccgtcccccac acatgtccag atcgaaatcg 480
tctagcgcgt cggcatgcgc catcgccacg tcctcgccgt ctaagtggag ctctgtcccc 540
aggctgacat cggctcggggg ggccgtggac agtctgcgcg tgtgtcccg cggggagaaag 600
gacaggcgcg gagccgccag ccccgccctc tcggggggcgt cgtcgtccgg gagatcgagc 660
aggccctcga tggtagaccc gtaattgttt ttcgtacgcg cgcggctgta cgcggaccca 720
ctttcacatt taagttgttt ttctaattcc catatgatca attcaaggcc gaataagaag 780
gctggctctg caccttggtg atcaaataat tcgatagctt gtcgtaataa tggcggcata 840
ctatcagtag taggtgtttc cttttcttct ttagcgactt gatgctcttg atcttccaat 900
acgcaacctc aagtaaaatg cccacagcg ctgagtgcatt ataatgcatt ctctagtga 960
aaaccttggt ggcataaaaa ggctaattga ttttcgagag tttcatactg tttttctgta 1020
ggcgtgtac ctaaatgtac ttttgctcca tcgcatgac ttagtaaaagc acatctaaaa 1080
cttttagcgt tattacgtaa aaaatcttgc cagctttccc cttctaaagg gcaaaagtga 1140
gtatggtgcc tatctaactc ctcaatggct aaggcgtcga gcaaagcccg cttatttttt 1200
acatgccaat acaatgtagg ctgctctaca cctagcttct gggcgagttt acgggttggt 1260
aaaccttcga ttccgacctc attaagcagc tctaattgcg tggttaatcac tttactttta 1320
tctaattctag agggctctggg tctctttggc atggtcgaat taattcgcgt cgagccggcc 1380
gcggttacaa ttccggttg acctgggagt ggacacctgt ggagagaaa gcaaagtgg 1440
tgtcattgtc actcaagtgt atggccagat ctcaagcctc ccacacctca agcttgacaa 1500
caaaaagatt gtcttttctg accagatgga cgcggccacc ctcaaaggca tcaccgcggg 1560
ccaggtgaat atcaaatcct cctcgttttt ggaaactgac aatcttagcg cagaagtc 1620
gcccgttttt gagagggagt actcacccca acagtcgaga ggttttccga tccggtcgat 1680
gcggtactgc tcaggtccct cgggtggcgga gtaccgttcg gaggccgacg ggtttccgat 1740
ccaagagtac tggaaagacc gcgaagagtt tgcctcaac cgcgagccca acaggcgctg 1800
aagcttgatg ggtcgtcgcg tggtcggagg cacacgcgtc accttaatat gcgaagtgg 1860
cctcggaccg cgccgccccg actgcatctg cgtgttcgaa ttgcccggcg agctcgactt 1920
tcacttttct ctatcactga tagggagtgg taaactcgac tttcactttt ctctatcact 1980
gatagggagt ggtaaactcg actttcactt ttctctatca ctgataggga gtggtaaaact 2040
cgactttcac ttttctctat cactgatagg gagtggtaaa ctcgactttc acttttctct 2100
atcactgata gggagtggta aactcgactt tcacttttct ctatcactga tagggagtgg 2160
taaactcgac tttcactttt ctctatcact gatagggagt ggtaaactcg acggtcgagg 2220
gtcagtagg cgtgtacggg gggaggccta tataagcaga gctcgtttag tgaaccgtca 2280
gatcgctcg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagacacc gggaccgatc 2340
cagcctccgc ggccccgaat tgcgaagctt tattgcggta gtttatcaca gttaaattgc 2400
taacgcagtc agtgcttctg acacaacagt ctcgaactta agctgcagaa gttggtcgtg 2460
aggcactggg caggtaagta tcaaggttac aagacaggtt taaggagacc aatagaaact 2520
gggcttgctg agacagagaa gactcttgcg tttctgatag gcacctattg gtcttactga 2580

catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactcccag	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgact	cactatagcg	tagcctcgag	aattcacgcg	tggtagccgag	2700
ctcggatcca	tgggtcacca	gcagttggtc	atctcttggg	tttccctggg	ttttctggca	2760
tctcccctcg	tggccatatg	ggaactgaag	aaagatgttt	atgtcgtaga	attggattgg	2820
tatccggatg	ccccctggaga	aatggtggtc	ctcacctgtg	acacccctga	agaagatggg	2880
atcacctgga	ccttggacca	gagcagtgag	gtcttaggct	ctggcaaaac	cctgaccatc	2940
caagtcaaag	agtttggaga	tgctggccag	tacacctgtc	acaaaggagg	cgaggttcta	3000
agccattcgc	tcctgtgct	tcacaaaaag	gaagatggaa	tttgggtccac	tgatatttta	3060
aaggaccaga	aagaacccaa	aaataagacc	tttctaagat	gcgaggccaa	gaattattct	3120
ggacgtttca	cctgtgtgtg	gctgacgaca	atcagtagtg	atttgacatt	cagtgtcaaa	3180
agcagcagag	gctcttctga	cccccaaggg	gtgacgtgcg	gagctgtctac	actctctgca	3240
gagagagtca	gaggggacaa	caaggagtat	gagtactcag	tggagtgccca	ggaggacagt	3300
gcctgcccag	ctgctgagga	gagtctgccc	attgaggtca	tgggtggatgc	cgttcacaa	3360
ctcaagtatg	aaaactacac	cagcagcttc	ttcatcaggg	acatcatcaa	acctgaccaca	3420
cccaacaact	tgcagctgaa	gccattaaag	aattctcggc	aggtggagggt	cagctgggag	3480
tacctgaca	cctggagtac	tccacattcc	tacttctccc	tgacattctg	cgttcaggtc	3540
cagggcaaga	gcaagagaga	aaagaaagat	agagtcttca	cggacaagac	ctcagccacg	3600
gtcatctgcc	gcaaaaaatgc	cagcattagc	gtgctggccc	aggaccgcta	ctatagctca	3660
tcttggagcg	aatgggcatc	tgtgccttgc	agtgggtggcg	gtggcgccgg	atctagaaac	3720
ctcccctgtg	ccactccaga	cccaggaatg	ttcccatgcc	ttcaccactc	ccaaaacctg	3780
ctgagggccg	tcagcaacat	gctccagaag	gccagacaaa	ctctagaatt	ttaccttgc	3840
acttctgaag	agattgatca	tgaagatata	acaaaagata	aaaccagcac	agtggaggcc	3900
tgtttaccat	tggaaattaac	caagaatgag	agttgcctaa	attccagaga	gacctcttcc	3960
ataactaatg	ggagttgcct	ggcctccaga	aagacctctt	ttatgatggc	cctgtgcctc	4020
tcgagtattt	atgaagactc	gaagatgtac	caggtggagt	tcaagaccat	gaatgcaaag	4080
cttctgatgg	atcctaagag	gcagatcttt	ctagatcaaa	acatgctggc	agttattgat	4140
gagctgatgc	aggccctgaa	tttcaacagt	gagactgtgc	cacaaaaatc	ctcccttgaa	4200
gaaccggatt	tttataaaaac	taaaatcaag	ctctgcatac	ttcttcatgc	tttcagaatt	4260
cgggcagtg	ctattgatag	agtgatgagc	tatctgaatg	cttccataaaa	agcgaggctg	4320
atccggatta	gtccaatttg	ttaaagacag	gatatacagt	gtccaggctc	tagttttgac	4380
tcaacaatat	caccagctga	agcctataga	gtacgagcca	tagataaaaat	aaaagatttt	4440
atttagtctc	cagaaaaagg	ggggaatgaa	agacccacc	tgtagggttg	gcaagctagt	4500
aacggccgcc	agtgtgctgg	aattctgcag	atatccatca	cactggcgcc	cgctcgagca	4560
tgcactatga	gggccctatt	ctatagtgtc	acctaaatgc	tagagctcgc	tgatcagcct	4620
cgactgtgcc	ttctagtgtc	cagccatctg	ttgtttgccc	ctccccctg	ccttccttga	4680
ccctggaagg	tgccactccc	actgtccttt	cctaataaaa	tgaggaaatt	gcatcgcat	4740
gtctgagtag	gtgtcattct	attctggggg	gtggggtggg	gcaggacagc	aagggggagg	4800
attgggaaga	caatagcagg	catgctgggg	atgctggggg	ctctatggct	tctgaggcgg	4860
aaagaaccag	tcgactcgaa	gatctggggc	tgggttaagg	tgggaaagaa	tatatagggt	4920
gggggtctta	tgtagttttg	tatctgtttt	gcagcagccg	cgccgcccat	gagcaccaac	4980
tcgtttgatg	gaagcattgt	gagctcatat	ttgacaacgc	gcatgcccc	atgggcccgg	5040
gtgcgtcaga	atgtgatggg	ctccagcatt	gatggtcgcc	ccgtcctgcc	cgcaaactct	5100
actaccttga	cctacgagac	cggtgtctga	acgccgttgg	agactgcagc	ctccgccgcc	5160
gcttcagccg	ctgcagccac	cgcccgccgg	attgtgactg	actttgcttt	cctgagcccc	5220
cttgcaagca	gtgcagcttc	ccgttcatcc	gcccgcgatg	acaagttgac	ggctcttttg	5280
gcacaatttg	attctttgac	ccgggaactt	aatgtcgttt	ctcagcagct	gttgatctg	5340
cgccagcagg	tttctgccc	gaaaggcttc	tcccctccca	atgctggtta	aaacataaat	5400
aaaaaaccag	actctgtttg	gatttggatc	aagcaagtgt	cttgctgtct	ttatttaggg	5460
gttttgccg	cgcggtaggc	ccgggaccag	cggtctcggt	cgttgagggt	cctgtgtatt	5520
ttttccagga	cgtggtaaag	gtgactctgg	atgttcagat	acatgggcat	aagcccgtct	5580
ctggggtgga	ggtagcacca	ctgcagagct	tcagtctgcg	gggtgggtgt	gtagatgatc	5640
cagtcgtagc	aggagcgctg	ggcgtgggtc	ctaaaaatgt	ctttcagtag	caagctgatt	5700
gccaggggca	ggcccttggg	gtaagtgttt	acaaagcggt	taagctggga	tgggtgcata	5760
cgtggggata	tgagatgcat	cttggaactgt	atttttaggt	tggctatgtt	cccagccata	5820
tcctcccggg	gattcatgtt	gtgcagaacc	accagcacag	tgtatccggg	gcacttggga	5880
aatttgtcat	gtagcttaga	aggaaatgcg	tggagaact	tggagacgcc	cttgtgacct	5940
ccaagatatt	ccatgcattc	gtccataatg	atggcaatgg	gcccacggcg	ggcgccctgg	6000
gcgaagatat	ttctgggata	actaacgtca	tagttgtgtt	ccaggatgag	atcgtcatag	6060
gccattttta	caaagcgcg	gcggagggtg	ccagactgcg	gtataatggg	tccatccggc	6120
ccaggggcgt	agttaccctc	acagatttgc	atttcccacg	ctttgagttc	agatgggggg	6180
atcatgtcta	cctgcggggc	gatgaagaaa	acggtttccg	gggtaggggg	gatcagctgg	6240

12/20

gaagaaagca	ggttcctgag	cagctgcgac	ttaccgcagc	cggtgggccc	gtaaatcacā	6300
cctattaccg	ggtgcaactg	gtagttaaga	gagctgcagc	tgccgtcatc	cctgagcagg	6360
ggggccactt	cgtaagcat	gtccctgact	cgcatgtttt	ccctgaccaa	atccgccāga	6420
aggcgctcgc	cgcccagcga	tagcagttct	tgcaaggaag	caaagttttt	caacggtttg	6480
agaccgtccg	ccgtaggcat	gcttttgagc	gtttgaccaa	gcagttccag	gcggtcccāc	6540
agctcgggtca	cctgctctac	ggcatctcga	tccagcatat	ctcctcgttt	cgcggtttg	6600
ggcggctttc	gctgtacggc	agtagtcggt	gctcgtccag	acgggcccagg	gtcatgtctt	6660
tccacggggcg	cagggtcctc	gtcagcgtag	tctgggtcac	ggtgaagggg	tgcgctccgg	6720
gctgcgcgct	ggccagggtg	cgcttgaggc	tggtcctgct	ggtgctgaag	cgctgccggt	6780
cttcgccctg	cgcgctcgcc	aggtagcatt	tgaccatggt	gtcatagtcc	agccccctccg	6840
cggcgtggcc	cttggcgcg	agcttgccct	tggaggaggc	gccgcacgag	gggcagtgcā	6900
gacttttgag	ggcgtagagc	ttggggcgca	gaaataccga	ttccggggag	taggcacccg	6960
cgccgcaggc	cccgcagacg	gtctcgcatt	ccacgagcca	ggtgagctct	ggcgttcgg	7020
ggtcaaaaac	caggtttccc	ccatgctttt	tgatgcgttt	cttacctctg	gtttccatga	7080
gccggtgtcc	acgctcgggtg	acgaaaaggc	tgctcgtgtc	cccgtataca	gacttgagag	7140
ggagtttaaa	cgaattcaat	agcttggtgc	atgggcggcg	atataaaatg	caaggtgctg	7200
ctcaaaaaat	caggcaaagc	ctcgcgcaaa	aaagaaagca	catcgtagtc	atgctcatgc	7260
agataaaggc	aggtaagctc	cggaaccacc	acagaaaaag	acaccatttt	tctctcaaac	7320
atgtctgcgg	gtttctgcat	aaacacaaaa	taaaataaca	aaaaaacatt	taaacattag	7380
aagcctgtct	tacaacagga	aaaacaaccc	ttataagcat	aagacgggact	acggccatgc	7440
cggcgtgacc	gtaaaaaaac	tggtcaccgt	gattaaaaag	caccaccgac	agctcctcgg	7500
tcatgtccgg	agtcataatg	taagactcgg	taaacacatc	aggttgattc	atcggtcagt	7560
gctaaaaagc	gaccgaaata	gcccggggga	atacataccc	gcaggcgtag	agacaacatt	7620
acagcccccā	taggaggtat	aacaaaatta	ataggagaga	aaaacacata	aacacctgaa	7680
aaaccctcct	gcctaggcaa	aatagcacc	tcccgtcca	gaacaacata	cagcgcttca	7740
cagcggcagc	ctaacagtca	gccttaccag	taaaaaagaa	aacctattaa	aaaaacacca	7800
ctcgacacgg	caccagctca	atcagtcaca	gtgtaaaaaa	gggccaagtg	cagagcgagt	7860
atatatagga	ctaaaaaatg	acgtaacggt	taaagtccac	aaaaaacacc	cagaaaaccg	7920
cacgcgaacc	tacgcccaga	aacgaaagcc	aaaaaaccca	caacttcctc	aaatcgtcac	7980
ttccggtttc	ccacgttacg	taacttccca	ttttaagaaa	actacaattc	ccaacacata	8040
caagttactc	cgccctaaaa	cctacgtcac	cgcccccggt	cccacgcccc	gcgccacgtc	8100
acaaactcca	ccccctcatt	atcatattgg	cttcaatcca	aaataaggta	tattattgat	8160
gatgttaatt	aacatgcatg	gatccatatg	cggtgtgaaa	taccgcacag	atgcgtaagg	8220
agaaaatacc	gcctcaggcg	ctcttcgctg	tcttcgctca	ctgactcgct	gcgctcggtc	8280
gttcggctgc	ggcgagcggt	atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	8340
tcagggggata	agcgaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	8400
aaaaaggccg	cggttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatacaaaa	8460
aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcggtt	8520
ccccctggaa	gtccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggataacctg	8580
tccgcctttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	8640
agttcgggtg	aggctcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	8700
gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagttcca	acccggtaa	acacgactta	8760
tcgccactcg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cgaggtatgt	aggcggtgct	8820
acagagttct	tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atttggtatc	8880
tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaaa	8940
caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	9000
aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	tctacgggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	9060
aactcacggt	aagggatttt	ggtcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	9120
ttaaattaaa	aatgaagttt	taaatcaatc	taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	9180
agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	atctcagcga	tctgtctatt	tcgttcatcc	9240
atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	gggagggtt	accatctggc	9300
cccagtgtcg	caatgatacc	gcgagaccca	cgctcaccgg	ctccagattt	atcagcaata	9360
aaccagccag	ccggaagggc	cgagcgcaga	agtggctcctg	caactttatc	cgctccatc	9420
cagtctatta	attgttgccg	ggaagctaga	gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgccg	9480
aacgttggtg	ccattgctgc	agccatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	9540
ttcacgtaga	aagccagtcc	gcagaaacgg	tgctgacccc	ggatgaatgt	cagctactgg	9600
gctatctgga	caagggaaaa	cgcaagcgca	aagagaaagc	aggtagcttg	cagtgggctt	9660
acatggcgat	agctagactg	ggcgggtttt	tggacagcaa	gcgaaccgga	attgccagct	9720
ggggcgccct	ctggttaagg	tgggaagccc	tgcgaagttaa	actggatggc	tttctcgccg	9780
ccaaggatct	gatggcgag	gggatcaagc	tgctatcaag	agacaggatg	aggatcggtt	9840
cgcgatgattg	aacaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttgggt	ggagaggcta	9900

```

ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg 9960
tcagcgcagg ggcccccggg tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtg cctgaatgaa 10020
ctgcaagacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcaggc 10080
gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg 10140
caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccagaaaag tatccatcat ggctgatgca 10200
atgcggcgcg tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaâacat 10260
cgcatcgagc gagcacgtac tcggatggaa gccgggtctt tcatcagga tgatctggac 10320
gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gagcatgccc 10380
gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa 10440
aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag 10500
gacatagcgt tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc 10560
ttcctcgtgc tttacgggat cgccgctccc gattcgcagc gcacgcctt ctatcgctt 10620
cttgacgagt tcttctgaat tttgttaaaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca 10680
ataggccgaa atcggcaaca tcccttataa atcaaaagaa tagaccgcga tagggttgag 10740
tggtgttcca gtttggaaaca agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg 10800
gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccca aatcaagttt 10860
tttgcggtcg aggtgccgta aagctctaaa tcggaaccct aaagggagcc cccgatttag 10920
agcttgacgg ggaagccggc cgaacgtggc gagaaaggaa ggggaagaaag cgaaaggagc 10980
gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggc cacgctgcgc gtaaccacca caccgcgcgc 11040
cttaatgcgc cgctacaggg cgctccatt cgccattcag gatcgaatta attcttaagt 11100
ttttbtaaca tcatcaataa tataccttat tttggattga agccaatatg ataatgaggg 11160
ggtggagttt gtgacgtggc gcggggcggt ggaacggggc ggggtgacgt gtagtgtggc 11220
ggaagtgtga tgttgcaagt gtggcggaac acatgtaagc gacggatgtg gcaaaagtga 11280
cgtttttggg gtgcgccggg gtacacagga agtgacaatt ttcgcgcggg tttaggcgga 11340
tgttgtagta aatttgggcg taaccgagta agatttgccc attttcgcgg gaaaactgaa 11400
taagaggaag tgaaatctga ataattttgt gttactcata gcgcgtaata ctg 11453

```

<210> 4

<211> 9784

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r zur regulierten Expression

<220>

<221> gene

<222> (327) .. (713)

<223> VP16

<220>

<221> gene

<222> (714) .. (1352)

<223> TetR

<220>

<221> Intron

<222> (1353) .. (1912)

<223>

<220>

<221> promoter

<222> (1864) .. (1902)

<223> TK-min

<220>

<221> protein_bind

<222> (1913) .. (2212)

14/20

<223> TetO7

<220>

<221> misc_feature

<222> (2213)..(2709)

<223> CMV-min + Intron

<220>

<221> promoter

<222> (2226)..(2264)

<223> CMV-min

<220>

<221> multiple cloning site

<222> (2669)..(2770)

<223> NheI, XhoI, KpnI, BamHI, SpeI, EcoRV, NotI, XhoI

<400> 4

ctgctgggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagccccaccg	catccccagc	atgcctgcta	60
ttgtcttccc	aatcctcccc	cttgcctgccc	tgccccacccc	cacccccccag	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttccc	tcatttttatt	aggaaaggac	agtgggagtg	180
gcaccttcca	gggtcaagga	aggcacggggg	gagggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tcgaggctga	tcagcgagct	ctagcatttta	ggtgacacta	tagaataggg	300
ccctctagga	tcgatcctcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aagggcatcg	360
gtaaacaatct	gctcaaactc	gaagtcgggc	atatccagag	cgccgtaggg	ggcggagtcg	420
tgggggggtaa	atccccgacc	cggggaatcc	ccgtccccc	acatgtccag	atcgaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcatgcgc	catcgccacg	tcctcgccgt	ctaagtggag	ctcgtccccc	540
aggctgacat	cggctggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtcccg	ggggagaaag	600
gacaggcgcg	gagccgccag	ccccgcctct	tcggggggcgt	cgctgcctcg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagacc	gtaattgttt	ttcgtagcgc	cgcggtctga	cgcggaacca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaattccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttggtg	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtataaa	tgccggcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttctctt	ttagcgactt	gatgctcttg	atcttccaat	900
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcatt	ataatgcatt	ctctagtga	960
aaaccttggt	ggcataaaaa	ggctaattga	ttttcgagag	tttcatactg	tttttctgta	1020
ggccgtgtac	ctaaatgtac	ttttgctcca	tcgcgatgac	ttagttaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttgc	cagctttccc	cttctaaagg	gcaaaagtga	1140
gtatggtgcc	tatctaacat	ctcaatggct	aaggcgctga	gcaaagcccg	cttatttttt	1200
acatgccaat	acaatgtagg	ctgctctaca	cctagcttct	gggcgagttt	acgggttggt	1260
aaaccttcga	ttccgacctc	attaagcagc	tctaattgcg	tgtaatacac	tttactttta	1320
tctaattctag	agggctctggg	tctctttggc	atggtcgaat	taattcgcgt	cgagccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccggttg	acctgggagt	ggacacctgt	ggagagaaaag	gcaaagtggg	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagcctg	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaaagatt	gtcttttctg	accagatgga	cgcgccacc	ctcaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccaggtgaat	atcaaatcct	cctcgttttt	ggaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcac	1620
gcccgtttt	gagagggagt	actcacccca	acagtcgaga	ggttttccga	tcgggtcgat	1680
gcggactcgc	tcaggtccct	cggtggcgga	gtaccgttcg	gagggccgacg	ggtttccgat	1740
ccaagagtac	tggaagacc	gcgaagagtt	tgctctcaac	cgcgagccca	acaggcgctc	1800
aagcttgatg	ggtcgctcgg	tggtcgaggc	cacacgcgtc	accttaatat	gcgaagtggg	1860
cctcggaccg	cgccgccccg	actgcatctg	cgtgttcgaa	ttgcccggcg	agctcgactt	1920
tcacttttct	ctatcactga	tagggagtgg	ttaactcgac	tttcaacttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	ggtaaaactcg	actttcactt	ttctctatca	ctgataggga	gtggtaaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	acttttctct	2100
atcactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcacttttct	ctatcactga	tagggagtgg	2160
taaactcgac	tttcaacttt	ctctatcact	gatagggagt	ggtaaaactcg	acggctcgagg	2220
gtcgagttag	cgtgtacggg	gggaggccta	tataagcaga	gctcggttag	tgaaccgtca	2280
gatcgctcgg	agacgccatc	cacgctgttt	tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggccccgaat	tgcaagctt	tattgcggta	gtttatcaca	gttaaattgc	2400
taacgcagtc	agtgttctg	acacaacagt	ctcgaactta	agctgcagaa	gttggtcgtg	2460
aggcactggg	caggtaaagta	tcaaggttac	aagacaggtt	taaggagacc	aatagaaact	2520
gggcttgctg	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	gcacctattg	gtcttactga	2580

catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactcccag	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgact	cactataggg	tagcctcgag	aattcacgag	tggtagccag	2700
ctcggatcca	ctagtaacgg	ccgccagtgt	gctggaattc	tgcagatata	catcacactg	2760
gcgcccgctc	gagcatgcat	ctagagggcc	ctattctata	gtgtcaccta	aatgctagag	2820
ctcgtgatc	agcctcgact	gtgccttcta	gttgccagcc	atctgttgtt	tgcctctccc	2880
ccgtgccttc	cttgaccctg	gaaggtgcca	ctcccactgt	cctttcctaa	taaaatgagg	2940
aaattgcata	gcattgtctg	agtaggtgtc	attctattct	ggggggtggg	gtggggcagg	3000
acagcaaggg	ggaggattgg	gaagacaata	gcaggcatgc	tggggatgag	gtgggctcta	3060
tggcttctga	ggcggaagga	accagtcgac	atcgatgcta	gagtgggaag	tgctgaggtg	3120
cgatgagacc	cgcaccaggt	gcagaccctg	cgagtgtggc	ggtaaacata	ttaggaacca	3180
gctgtgatg	ctggatgtga	ccgaggagct	gaggcccgat	cacttgggtg	tggcctgcac	3240
ccgcgctgag	tttggctcta	gcgatgaaga	tacagattga	ggtagtgaaa	tgtgtggggc	3300
tggcttaagg	gtgggaagga	atatataagg	tgggggtctt	atgtagtttt	gtatctgttt	3360
tgcagcagcc	gcccgcgcca	tgagcaccaa	ctcgtttgat	ggaagcattg	tgagctcata	3420
tttgacaacg	cgcatgcccc	catgggcccg	ggtgcgtcag	aatgtgatgg	gctccagcat	3480
tgatggctgc	cccgtcctgc	ccgcaaaactc	tactaccttg	acctacgaga	ccgtgtctgg	3540
aacgcccgtt	gagactgcag	cctccgcccgc	cgcttcagcc	gctgcagcca	ccgcccgcgg	3600
gattgtgact	gactttgctt	tcctgagccc	gcttgcaagc	agtgcagctt	cccgttcate	3660
cgcccgcgat	gacaagttga	cggtcttttt	ggcacaattg	gattctttga	cccgggaact	3720
taatgtcggt	tctcagcagc	tgttggatct	gcgccagcag	gtttctgccc	tgaaggcttc	3780
ctcccctccc	aatgcgggtt	aaaacataaa	taaaaaacca	gactctgttt	ggatttggat	3840
caagcaagtg	tcttgctgtc	tttatttagg	ggttttgcgc	gcgcggtagg	cccgggacca	3900
gcggtctcgg	tcgttgaggg	tcctgtgtat	tttttccagg	acgtggtaaa	ggtgactctg	3960
gatgttcaga	tacatgggca	taagcccgtc	tcctgggtgg	aggtagcacc	actgcagagc	4020
ttcatgctgc	ggggtgggtg	tgtagatgat	ccagtcgtag	caggagcgct	gggctgggtg	4080
cctaaaaaatg	tctttcagta	gcaagctgat	tgccaggggc	aggcccttgg	tgtaagtgtt	4140
tacaaagcgg	ttaagctggg	atgggtgcat	acgtggggat	atgagatgca	tcttgactg	4200
tatttttagg	ttggctatgt	tcccagccat	atccctccgg	ggattcatgt	tgtgcagaac	4260
caccagcaca	gtgtatccgg	tgcaacttgg	aaatttgtca	tgtagcttag	aaggaaatgc	4320
gtggaagaac	ttggagacgc	ccttgtgacc	tccaagattt	tccatgcatt	cgtccataat	4380
gatggcaatg	ggcccacggg	cggcggcctg	ggcgaagata	tttctgggat	cactaacgtc	4440
atagttgtgt	tccaggatga	gategtcata	ggccattttt	acaaagcgcg	ggcggagggt	4500
gccagactgc	ggtataatgg	ttccatccgg	ccagggggcg	tagttaccct	cacagatttg	4560
catttcccac	gctttgagtt	cagatggggg	gatcatgtct	acctgcgggg	cgatgaagaa	4620
aacggtttcc	ggggtagggg	agatcagctg	ggaagaaagc	aggttcctga	gcagctgcga	4680
cttaccgcag	ccggtggggc	cgtaaatcac	acctattacc	gggtgcaact	ggtagttaag	4740
agagctgcag	ctgccgtcat	ccctgagcag	gggggccact	tcgttaagca	tgtccctgac	4800
tcgcatgttt	tccctgacca	aatccgcccag	aaggcgctcg	ccgccagcgg	atagcagttc	4860
ttgcaaggaa	gcaaagtttt	tcaacggttt	gagaccgtcc	gccgtaggca	tgcttttgag	4920
cgtttgacca	agcagttcca	ggcgggtccc	cagctcggtc	acctgctcta	cgcatctctg	4980
atccagcata	tctcctcggt	tcgcgggttg	ggcgggcttt	cgctgtacgg	cagtagtcgg	5040
tgctcgtcca	gacgggcccag	ggtcatgtct	ttccacgggc	gcagggtcct	cgctcagcga	5100
gtctgggtca	cgggtgaagg	gtgcgtcccg	ggctgcgcgc	tggccagggt	gcgcttgagg	5160
ctggtcctgc	tgggtgctgaa	gcgctgcggg	tcttcgccct	gcgcgtcggc	caggtagcat	5220
ttgaccatgg	tgtcatagtc	cagccccctc	gcggcggtgg	ccttggcggc	cagcttgccc	5280
ttggaggagg	cgccgcacga	ggggcagtg	agacttttga	gggcgtagag	cttgggcggc	5340
agaaataacc	attccgggga	gtaggcatcc	gcgccgaggg	ccccgcagac	ggtctcgcat	5400
tccacgagcc	aggtgagctc	tggccgttcg	gggtcaaaaa	ccagggttcc	cccatgcttt	5460
ttgatgcgtt	tcttacctct	ggtttccatg	agccggtgtc	cacgctcggt	gacgaaaagg	5520
ctgtccgtgt	ccccgtatac	agacttgaga	ggcctgtcct	cgaccgatgc	ccttgagagc	5580
cttcaaccca	gtcagctcct	tccggtgggc	gcggggcatg	actatcgctg	ccgcacttat	5640
gactgtcttc	tttatcatgc	aactcgtagg	acagggtgcc	gcagcgctct	gggtcatttt	5700
cggcgaggac	cgctttcgct	ggagcgcgac	gatgatcggc	ctgtcgcttg	cggtattcgg	5760
aatcttgcac	gccctcgctc	aagccttcgt	cactggtccc	gccaccaaac	gtttcggcga	5820
gaagcaggcc	attatcgccg	gcattggcgg	cgacgcgctg	ggctacgtct	tgttggcggt	5880
cgcgacgcga	ggctggatgg	ccttccccat	tatgattctt	ctcgtttccg	gcggcatcgg	5940
gatgcccgcg	ttgcaggcca	tgtgtccag	gcaggtagat	gacgaccatc	agggacagct	6000
tcaaggatcg	ctcgcggctc	ttaccagcct	aacttcgata	actggaccgc	tgatcgctac	6060
ggcgatttat	gccgcctcgg	cgagcacatg	gaacgggttg	gcattggattg	taggcggcgc	6120
cctatacctt	gtctgcctcc	ccgcgttgcg	tcgcgggtga	tggagccggg	ccacctcgac	6180
ctgaatggaa	gccggcgggc	cctcgctaac	ggattcacca	ctccaagaat	tggagccaat	6240

cáattcttgc	ggagaactgt	gaatgcgcaa	accaaccctt	ggcagaacat	atccatcgcg	6300
tccgccatct	ccagcagccg	cacgcggcgc	atctcgggca	gcgttgggtc	ctggccacgg	6360
gtgcgcatga	tcgtgtcctt	gtcgttgagg	accgggctag	gctggcgggg	ttgccttáct	6420
ggtttagcaga	atgaatcacc	gatacgcgag	cgaacgtgaa	gcgactgctg	ctgcaaaaacg	6480
tctgcgacct	gagcaacaac	atgaatggtc	ttcggtttcc	gtgtttcgta	aagtctggaa	6540
acgcggaagt	cagcgccctg	caccattatg	ttcgggatct	gcacgcgagg	atgctgctgg	6600
ctaccctgtg	gaacacctac	atctgtatta	acgaagcgct	ggcattgacc	ctgagtátt	6660
tttctctggg	cccgcgcgat	ccataccgcc	agttgtttac	cctcacaacg	ttccagtaac	6720
cgggcatggt	catcatcagt	aacccgatc	gtgagcatcc	tctctcgttt	catcggtatc	6780
attaccccca	tgaacagaaa	ttccccctta	cacggaggca	tcaagtgacc	aaacaggaaa	6840
aaaccgacct	taacatggcc	cgctttatca	gaagccagac	attaacgctt	ctggagaaac	6900
tcaacgagct	ggacgcggat	gaacaggcag	acatctgtga	atcgcttcac	gaccacgctg	6960
atgagcttta	ccgcagctgc	ctcgcgcggt	tcgggtgatga	cggtgaaaac	ctctgacaca	7020
tgcagctccc	ggagacgggt	acagcttgct	tgtaagcggg	tgccgggagc	agacaagccc	7080
gtcagggcgc	gtcagcgggt	gttggcgggt	gtcggggcgc	agccatgacc	cagtacagta	7140
gcgatagcgg	agtgtatact	ggcttaacta	tgccggcatc	gagcagattg	tactgagagt	7200
gcaccatagt	cgggtgtgaa	taccgcacag	atgcgtaagg	agaaaatacc	gcacaggcg	7260
ctcttcgcgt	tcctcgctca	ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggg	7320
atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	7380
gaacatgtga	gcaaaaaggcc	agcaaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgctggc	7440
gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcacacaaaa	aatcgacgct	caagtcagag	7500
gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	gtccctcgt	7560
gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggatacctg	tcgcctttc	tcccttcggg	7620
aagcgtggcg	ctttctcaat	gtcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggtcggtcg	7680
ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgctcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	7740
taactatcgt	cttgagtcca	acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	7800
tggttaacagg	attagcagag	cgaggtagt	aggcgggtgct	acagagttct	tgaagtgggtg	7860
gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atttggtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	7920
taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	7980
tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	8040
tttgatcttt	tctacggggg	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	aagggatttt	8100
ggatcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagttt	8160
taaatcaatc	taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	agttaccaat	gcttaaccag	8220
tgaggcacct	atctcagcga	tctgtctatt	tcgttcaccc	atagttgcct	gactccccgt	8280
cgtgtagata	actacgatac	gggagggcct	accatctggc	cccagtgctg	caatgatacc	8340
gcgagaccca	cgctcaccgg	ctccagattt	atcagcaata	aaccagccag	ccggaagggc	8400
cgagcgcaga	agtggtcctg	caactttatc	cgctccatc	cagtctatta	attggtgccg	8460
ggaagctaga	gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgccg	aacggtggtg	ccattgctgc	8520
aggcatcgtg	gtgtcacgct	cgctggttgg	tatggcttca	ttcagctccg	gttcccaacg	8580
atcaaggcga	gttacatgat	cccccatggt	gtgcaaaaaa	gcgggttagct	ccttcgggtc	8640
tccgatcggt	gtcagaagta	agttggccgc	agtgttatca	ctcatggtta	tggcagcact	8700
gcataattct	cttactgtca	tgccatccgt	aagatgcttt	tctgtgactg	gtgagtactc	8760
aaccaagtca	ttctgagaat	agtgtatgcg	gcgaccgagt	tgctcttgcc	cggcgtaaac	8820
acgggataat	accgcgccac	atagcagaac	tttaaaagtg	ctcatcattg	gaaaacgttc	8880
ttcggggcga	aaactctcaa	ggatcttacc	gctgttgaga	tccagttcga	tgtaaaccac	8940
tcgtgcaccc	aactgatctt	cagcatcttt	tactttcacc	agcgtttctg	ggtgagcaaa	9000
aacaggaagg	caaaatgccg	caaaaaaggg	aataagggcg	acacggaaat	ggtgaatact	9060
catactcttc	ctttttcaat	attattgaag	catttatcag	ggttattgtc	tcatgagcgg	9120
atacatatct	gaatgtatct	agaaaaataa	acaaataggg	gttccgcgca	catttccccg	9180
aaaagtgcc	cctgacgtct	aagaaacat	tattatcatg	acattaacct	ataaaaaatg	9240
gcgtatcacg	aggccctttc	gtcttcaaga	attcttatca	tgacattaac	ctataaaaaat	9300
aggcgatatca	cgaggccctt	tcgtcatcat	caataatata	ccttattttg	gattgaagcc	9360
aatatgataa	tgaggggggtg	gagtttgtga	cgtggcgccg	ggcgtgggaa	cggggcgggg	9420
gacgtagtag	gtgggcggaa	gtgtgatggt	gcaagtgtgg	cggaaacacat	gtaagcgccg	9480
gatgtggtaa	aagtgcggtt	tttgggtgtg	gccggtgtat	acgggaagtg	acaattttcg	9540
cgcggtttta	ggcggatggt	gtagtaaatt	tgggcgtaac	caagtaatgt	ttggccattt	9600
tcgcgggaaa	actgaataag	aggaagtga	atctgaataa	ttctgtgtta	ctcatagcgc	9660
gtaatatattg	tctagggccg	cggggacttt	gaccgtttac	gtggagactc	gcccagggtg	9720
ttttctcagg	tgttttccgc	gttccggggtc	aaagttggcg	ttttattatt	atagtcagct	9780
ctag						9784

<210> 5
 <211> 9668
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Expressionsplasmid pShuttle.3r zur regulierten
 Expression nach Virusgeneration mittels AdEasy

<220>
 <221> gene
 <222> (327)..(713)
 <223> VP16

<220>
 <221> gene
 <222> (714)..(1352)
 <223> TetR

<220>
 <221> Intron
 <222> (1353)..(1912)
 <223>

<220>
 <221> promoter
 <222> (1864)..(1902)
 <223> TK-min

<220>
 <221> protein_bind
 <222> (1913)..(2212)
 <223> TetO7

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2213)..(2709)
 <223> CMV-min + Intron

<220>
 <221> promoter
 <222> (2226)..(2264)
 <223> CMV-min

<220>
 <221> multiple cloning site
 <222> (2669)..(2770)
 <223> NheI, XhoI, KpnI, SpeI, EcoRV, NotI, XhoI

<400> 5
 ctgctggttc tttccgcttc agaagccata gagccccaccg catccccagc atgcctgcta 60
 ttgtcttccc aatcctcccc cttgctgtcc tgccccaccc cccccccag aatagaatga 120
 cacctactca gacaatgcga tgcaatttcc tcattttatt aggaaaggac agtgggagtg 180
 gcaccttcca ggggtcaagga aggcacgggg gaggggcaaa caacagatgg ctggcaacta 240
 gaaggcacag tcgaggctga tcagcgagct ctagcattta ggtgacacta tagaataggg 300
 ccctctagga tcgatcctcg cgccccctac ccaccgtact cgtcaattcc aaggggcatcg 360
 gtaaacaatct gctcaaactc gaagtcggcc atatccagag cgccgtaggg ggcggagtcg 420
 tggggggtaa atcccggacc cggggaatcc ccgtcccccac acatgtccag atcgaaatcg 480
 tctagcgcgt cggcatgcgc catcgccacg tctcgcgcgt ctaagtggag ctcgtccccc 540
 aggtgacat cggtcggggg ggccgtcgat agtctgcgcg tgtgtcccgc ggggagaaaag 600

gacaggcgcg	gagccgccag	ccccgeectct	tcggggggcgt	cgtcgctccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtaattgttt	ttcgtagcg	cgcggtctgta	cgcggaacca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaataccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttggtg	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtaataa	tggcggcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttcttct	ttagcgactt	gatgctcttg	atcttccaat	900
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcac	ataacgcgtt	ctctagtga	960
aaaccttggt	ggcataaaaa	ggctaattga	ttttcgagag	tttcatactg	tttttctgta	1020
ggccgtgtat	ctgaatgtac	ttttgctcca	ttcgatgac	ttagtaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattgcgtaa	aaaatcttgc	cagctttccc	cttttaaagg	gcaaaagtga	1140
gtatgggtgcc	tatctaacat	ctcaatggct	aaggcgctga	gcaaagcccg	cttatttttt	1200
acatgccaat	acagtgtagg	ctgctctaca	ccaagcttct	ggcgaggttt	acgggttggt	1260
aaaccttcga	ttccgacctc	attaagcagc	tctaattgcg	tgtaaatcac	tttactttta	1320
tctaactctag	agggctctggg	tctctttggc	atggctgaat	taattcgctg	cgagccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccggttgg	acctgggagt	ggacacctgt	ggagagaaaag	gcaaagtggga	1440
tgctattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagcctg	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaaagatt	gtcttttctg	accagatgga	cgcggccacc	ctcaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccaggtgaat	atcaaatcct	cctcgttttt	ggaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcac	1620
gcccgcctttt	gagagggagt	actcacccca	acagtcgaga	ggttttccga	tccggctgat	1680
gcggactcgc	tcaggtccct	cgggtggcga	gtaccgttcg	gaggccgacg	ggtttccgat	1740
ccaagagtac	tggaaagacc	gcgaagagtt	tgtcctcaac	cgcgagccca	acaggcgctc	1800
aagcttgatg	ggctcgctcg	tgctcgaggc	cacacgcgtc	accttaatat	gcgaagtggga	1860
cctcggaacc	cgccgccccg	actgcactct	cgtgttcgaa	ttgcccggcg	agctcgactt	1920
tcacttttct	ctatcactga	tagggagtgg	taaactcgac	tttcaacttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	ggtaaaactcg	acttttcaact	ttctctatca	ctgatagggga	gtggtaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	acttttctct	2100
ataactgata	gggagtggta	aactcgactt	tacttttctc	ctatcactga	tagggagtgg	2160
tttaactcgac	tttcaactttt	ctctatcact	gatagggagt	ggtaaaactcg	acggctcgagg	2220
gtcgagtagg	cgtgtacggg	gggaggccta	tataagcaga	gctcgtttag	tgaaccgtca	2280
gatcgctcgg	agacgccatc	cacgctgttt	tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggccccgaat	tgcaagcgtt	tattgcccgt	gtttatcaca	gttaaattgc	2400
taacgcagtc	agtgtctctg	acacaacagt	ctcgaactta	agctgcagaa	gttggctcgtg	2460
aggcactggg	caggtaagta	tcaaggttac	aagacagggt	taaggagacc	aatagaaaact	2520
gggcttgctg	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	gcacctattg	gtcttactga	2580
catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactccag	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgact	cactataggc	tagcctcgag	aattcacgcg	tggtagccag	2700
ctcgatcca	ctagtaacgg	ccgccagtgt	gctggaattc	tgcatatc	catcacactg	2760
gcggccgctc	gagcatgcat	ctagagggcc	ctattctata	gtgtcaccta	aatgctagag	2820
ctcgctgac	agcctcgact	gtgccttcta	gttgccagcc	atctgttggt	tgccccctcc	2880
ccgtgccttc	cttgaccctg	gaagggtgcca	ctccactgt	cctttcctaa	taaaatgagg	2940
aaattgcac	gcattgtctg	agtaggtgtc	attctattct	gggggggtggg	gtggggcagg	3000
acagcaaggg	ggaggattgg	gaagacaata	gcaggcatgc	tggggatgcg	gtgggctcta	3060
tggcttctga	ggcggaagaa	accagtcgac	tccaagatct	ggcggtggtt	aagggtggga	3120
aagaatata	aaggtggggg	tcttatgtag	ttttgtatct	gttttgcagc	agccgcccgc	3180
gccatgagca	ccaactcggt	tgatggaagc	attgtgagct	catatttgac	aacgcgcag	3240
cccccatggg	ccgggggtgcg	tcagaatgtg	atgggctcca	gcattgatgg	tcgccccgtc	3300
ctgcccgcga	actctactac	cttgacctac	gagaccgtgt	ctggaacgcc	gttggagact	3360
gcagcctccg	ccgcgccttc	agccgctgca	gccaccgccc	gcgggattgt	gactgacttt	3420
gctttcctga	gcccgccttg	aagcagtgca	gcttcccgtt	catccgcccg	cgatgacaag	3480
ttgacggctc	ttttggcaca	attggattct	ttgaccggg	aacttaattg	cgtttctcag	3540
cagctgttgg	atctgcgcca	gcagggttct	gccctgaagg	gttctctccc	tcccaatgcg	3600
gttttaaaaca	taaataaaaa	accagactct	gtttggattt	ggatcaagca	agtgtcttgc	3660
tgtctttatt	taggggtttt	gcgcgcgcgg	taggcccggg	accagcggtc	tcggctcgtt	3720
agggctcgtg	gtattttttc	caggacgtgg	ttaaagggtg	tctggatgtt	cagatacatg	3780
ggcataagcc	cgtctctggg	gtggaggtag	caccactgca	gagcttcatg	ctgcgggggtg	3840
gtgttgtaga	tgatccagtc	gtagcaggag	cgctgggcgt	gggtgcctaaa	aatgtctttc	3900
agtagcaagc	tgattgccag	gggcaggccc	ttgggtgtaag	tgtttacaaa	gcgggttaagc	3960
tgggatgggt	gcatacgtgg	ggatatgaga	tgcatcttgg	actgtatttt	taggttggtc	4020
atgttcccag	ccatatccct	ccgggggattc	atgttggtgca	gaaccaccag	cacagtgtat	4080
ccggtgcact	tgggaaattt	gtcatgtagc	ttagaaggaa	atgcgtggaa	gaacttggag	4140
acgcccttgt	gacctccaag	attttccatg	cattcggtcca	taatgatggc	aatgggccc	4200
cgggcggcgg	cctgggcgaa	gatatttctg	ggatcactaa	cgatcatagtt	gtgttccagg	4260

atgagatcgt	cataggccat	ttttacaaag	cgcgggcgga	gggtgccaga	ctgcggtata	4320
atgggtccat	ccggcccagg	ggcgtagtta	ccctcacaga	tttgcatctt	ccacgctttg	4380
agttcagatg	gggggatcat	gtctacctgc	ggggcgatga	agaaaacggt	ttccggggta	4440
ggggagatca	gctgggaaga	aagcagggttc	ctgagcagct	gcgacttacc	gcagccggtg	4500
ggcccgtaaa	tcacacctat	taccgggtgc	aactggtagt	taagagagct	gcagctgccg	4560
tcacccctga	gcaggggggc	cacttcgtta	agcatgtccc	tgactcgcat	gttttccttg	4620
accaaattccg	ccagaaggcg	ctcgcgcgcc	agcgatagca	gttcttgcaa	ggaagcaaag	4680
tttttcaacg	gtttgagacc	gtccgcgcta	ggcatgcttt	tgagcggttg	accaagcagt	4740
tccaggcggt	cccacagctc	ggtcacctgc	tctacggcat	ctcgatccag	catatctcct	4800
cgttttcgcg	gttggggcgg	ctttcgctgt	acggcagtag	tcggtgctcg	tccagacggg	4860
ccagggtcat	gtctttccac	gggcgcagg	tcctcgtcag	cgtagtctgg	gtcacggtga	4920
aggggtgcgc	tccgggctgc	gcgctggcca	gggtgcgctt	gaggctggtc	ctgctggtgc	4980
tgaagcgctg	ccgggtcttcg	ccctgcgcgt	cggccaggta	gcatttgacc	atggtgtcat	5040
agtccagccc	ctccgcggcg	tggcccttgg	cgcgcagctt	gcccttggag	gaggcgccgc	5100
acgaggggca	gtgcagactt	ttgaggcgct	agagcttggg	cgcgagaaat	accgattccg	5160
gggagtaggc	atccgcgcgc	caggccccgc	agcgggtctc	gcattccacg	agccagggtga	5220
gctctggccg	ttcgggggtca	aaaaccagg	ttcccccatg	ctttttgatg	cgtttcttac	5280
ctctgggttc	catgagccgg	tgtccacgct	cgggtgacga	aaggctgtcc	gtgtccccgt	5340
atacagactt	gagagggagt	ttaaaccgaat	tcaatagctt	gttgcatggg	cggcgatata	5400
aatgcaagg	tgctgctcaa	aaaatcaggc	aaagcctcgc	gcaaaaaaga	aagcacatcg	5460
tagtcatgct	catgcagata	aaggcaggta	agctccggaa	ccaccacaga	aaaagacacc	5520
atttttctct	caaacatgtc	tgcggggttc	tgcataaaca	caaaaataaa	taacaaaaaa	5580
acatttaaac	attagaagcc	tgtcttacia	caggaaaaac	aacccttata	agcataagac	5640
ggactacggc	catgccggcg	tgaccgtaaa	aaaactggtc	accgtgatta	aaaagcacca	5700
ccgacagctc	ctcggctcatg	tccggagtca	taatgttaaga	ctcggtaaac	acatcagggt	5760
gattcatcgg	tcagtgtctaa	aaagcgaccg	aaatagcccc	ggggaataca	taccgcgagg	5820
cgtagagaca	acattacagc	ccccatagga	ggtataacaa	aattaatagg	agagaaaaaac	5880
acataaacac	ctgaaaaacc	ctcctgccta	ggcaaaatag	caccctcccc	ctccagaaca	5940
acatacagcg	cttcacagcg	gcagcctaac	agtcagcctt	accagtaaaa	aagaaaaacct	6000
attaaaaaaa	caccactcga	cacggcacca	gctcaatcag	tcacagtgtg	aaaaagggcc	6060
aagtgcagag	cgagtatata	taggactaaa	aatgacgta	acggttaaag	tccacaaaaa	6120
acacccagaa	aaccgcacgc	gaacctacgc	ccagaaacga	aagccaaaaa	accacaact	6180
tcctcaaatc	gtcacttcgc	ttttcccacg	ttacgttaact	tcccatTTTA	agaaaactac	6240
aattcccaac	acatacaagt	tactccgccc	taaaacctac	gtcaccgcgc	ccgttcccac	6300
gccccgcgcc	acgtcacaaa	ctccaccccc	tcattatcat	attggcttca	atccaaaata	6360
aggatatatta	ttgatgatgt	taattaacat	gcatggatcc	atatgcgggtg	tgaaataaccg	6420
cacagatgcg	taaggagaaa	ataccgcata	aggcgtctct	ccgcttccctc	gctcactgac	6480
tcgctgcgct	cggtcggttcg	gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	ggcggttaata	6540
cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	6600
aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcggtt	ctggcgTTTT	tccataggct	ccgccccctc	6660
gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagaggtggc	gaaacccgac	aggactataa	6720
agataccagg	cgTTTTcccc	tggaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gaccctgccg	6780
cttacccgat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	tcatagctca	6840
cgctgtagg	atctcagttc	gggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	6900
ccccccgttc	agcccgaccg	ctgcgcctta	tccggtaact	atcgtcttga	gtccaacccg	6960
gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	7020
tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	tggtggccta	actacggcta	cactagaagg	7080
acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	agttggtagc	7140
tcttgatccg	gcaaaacaa	caccgctggg	agcgggtggt	tttttgTTTT	caagcagcag	7200
attacgcgca	gaaaaaaagg	atctcaagaa	gatcctttga	tcttttctac	ggggtctgac	7260
gtcagtgga	acgaaaactc	acgttaagg	atTTTtgTca	tgagattatc	aaaaaggatc	7320
ttcacctaga	tcctTTTTaa	ttaaaaatga	agTTTTaaat	caatctaaag	tatatatgag	7380
taaaacttggt	ctgacagtta	ccaatgctta	atcagtggag	cacctatctc	agcgatctgt	7440
ctatttcggt	catccatagt	tgcctgactc	cccgtcggtg	agataactac	gatacgggag	7500
ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	ataccgcgag	accacacgctc	accggctcca	7560
gatttatcag	caataaaacca	gccagccgga	agggccgagc	gcagaagtgg	tcttgcaact	7620
ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	7680
gttaatatgt	tgcgcaacgt	tgttgccatt	gctgcagcca	tgagattatc	aaaaaggatc	7740
ttcacctaga	tcctTTTTac	gtagaaagcc	agtcgcgaga	aacgggtgctg	accccggtatg	7800
aatgtcagct	actgggctat	ctggacaagg	gaaaacgcaa	gcgcaaagag	aaagcaggta	7860
gcttgacgtg	ggcttacatg	gcgatagcta	gactgggcgg	ttttatggac	agcaagcgaa	7920

ccggaattgc	cagctggggc	gccctctggt	aagggtggga	agccctgcaa	agtaaactgg	7980
atggctttct	cgccgccaag	gatctgatgg	cgcaggggat	caagctctga	tcaagagaca	8040
ggatgaggat	cgtttcgcat	gattgaacaa	gatggattgc	acgcagggtc	tccggccgct	8100
tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggctg	ctctgatgcc	8160
gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcagggggcg	cgggttcttt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	8220
ggtgccctga	atgaactgca	agacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	8280
gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgct	actgaagcgg	gaagggactg	gctgctattg	8340
ggcgaaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	gaaagtatcc	8400
atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	cccattcgac	8460
caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaaagccgg	tcttgtcgat	8520
caggatgatc	tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactgtt	cgccaggctc	8580
aaggcgagca	tgcccgacgg	cgaggatctc	gtcgtgaccc	atggcgatgc	ctgcttgccg	8640
aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	gctgggtgtg	8700
gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata	ttgctgaaga	gcttggcggc	8760
gaatgggctg	accgcttcct	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgattc	gcagcgcac	8820
gccttctatc	gccttcttga	cgagttcttc	tgaattttgt	taaaattttt	gttaaatacag	8880
ctcatttttt	aaccaatagg	ccgaaatcgg	caacatccct	tataaatcaa	aagaatagac	8940
cgcgataggg	ttgagtgttg	ttccagtttg	gaacaagagt	ccactattaa	agaacgtgga	9000
ctccaacgtc	aaaggcgaa	aaaccgtcta	tcagggcgat	ggccactac	gtgaaccatc	9060
acccaaatca	agttttttgc	ggtcgagggtg	ccgtaaagct	ctaaatcgga	accctaaagg	9120
gagccccga	tttagagctt	gacggggaaa	gccggcgaa	gtggcgagaa	aggaagggaa	9180
gaaagcgaaa	ggagcggggc	ctagggcgct	ggcaagtgtg	gcggtcacgc	tgcgcgtaac	9240
caccacaccc	gcgcgcttaa	tgcgccgcta	cagggcgcg	ccattcgcca	ttcaggatcg	9300
aattaattct	taagtttttb	taacatcatc	aataatatac	cttatttttg	attgaagcca	9360
atatgataat	gagggggtg	agtttgtgac	gtggcgcg	gcgtgggaac	ggggcggggtg	9420
acgtagtagt	gtggcggaag	tgtgatgttg	caagtgtggc	ggaacacatg	taagcgacgg	9480
atgtggcaaa	agtgcggtt	ttggtgtg	cgggtgtaca	caggaagtga	caattttcgc	9540
gcggttttag	gcggatgttg	tagtaaattt	gggcgtaacc	gagtaagatt	tggccatttt	9600
cgcgggaaaa	ctgaataaga	ggaagtgaaa	tctgaataat	tttgtgttac	tcatagcgcg	9660
taatactg						9668

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Oktober 2003 (23.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/087294 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/861**,
15/63, A61K 48/00

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP03/03638**

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. April 2003 (08.04.2003)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
102 16 800.8 15. April 2002 (15.04.2002) DE
102 22 513.3 17. Mai 2002 (17.05.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EP-
PENDORF** [DE/DE]; Martinistrasse 52, 20246 Hamburg
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BLOCK, Andreas**
[DE/DE]; Lokstedter Steindamm 80; 22529 Hamburg
(DE).

(74) Anwälte: **WEBER-QUITZAU, Martin** usw.; Uexküll &
Stolberg, Beselerstrasse 4, 22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

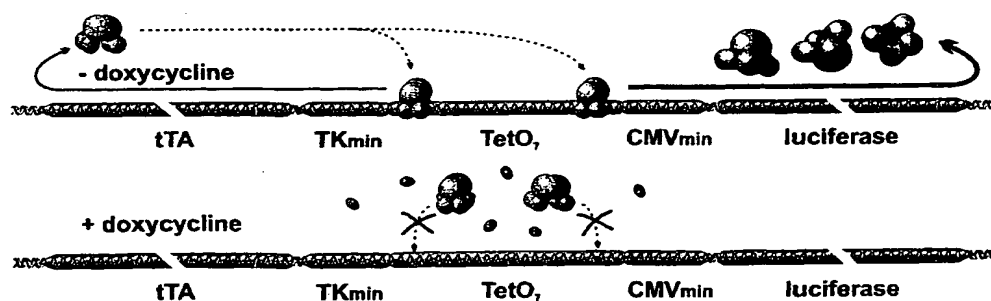
(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **RECOMBINING VIRAL VECTORS FOR THE TETRACYCLINE-REGULATED EXPRESSION OF GENES**

(54) Bezeichnung: **REKOMBINANTE VIRALE VEKTOREN ZUR TETRACYCLINREGULIERBAREN GENEXPRESSION**

Tet-OFF system



(57) Abstract: The invention relates to recombining viral vectors which can be suppressed in a highly efficient manner by means of tetracycline or tetracycline derivatives, and the use thereof for expressing genes in eukaryotic cells, particularly within the framework of gene therapy.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft rekombinante virale Vektoren, die durch Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivate, wie z.B. Doxycyclin, hocheffizient supprimiert werden können, sowie deren Verwendung zur Durchführung einer Genexpression in Eukaryontenzellen, insbesondere im Rahmen einer Gentherapie.



TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen**Recherchenberichts:**

24. Dezember 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/03638

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/861 C12N15/63 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols).

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>NAKAGAWA SHINSAKU ET AL: "Tetracycline-regulatable adenovirus vectors: Pharmacologic properties and clinical potential" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 13, no. 1, April 2001 (2001-04), pages 53-60, XP002258697 ISSN: 0928-0987 the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-3,5-18



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 October 2003

Date of mailing of the international search report

10/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/03638

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STRATHDEE C A ET AL: "Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector" GENE, vol. 229, no. 1-2, 18 March 1999 (1999-03-18), pages 21-29, XP004161154 ISSN: 0378-1119 abstract; figures 1,2	1-3,5-18
A	EP 1 092 771 A (BASF AG ;KNOLL AG (DE)) 18 April 2001 (2001-04-18) paragraph '0059! paragraph '0087! - paragraph '0092! paragraph '0094! figures 6,7B	1-18
A	EP 1 083 227 A (UNIV BRUXELLES) 14 March 2001 (2001-03-14) paragraph '0056!; figure 6	1-18
A	UNSINGER J ET AL: "Retroviral vectors for the transduction of autoregulated, bidirectional expression cassettes." MOLECULAR THERAPY: THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, vol. 4, no. 5, November 2001 (2001-11), pages 484-489, XP002258698 ISSN: 1525-0016 figures 1,2	1-18
A	BARON U ET AL: "CO-REGULATION OF TWO GENE ACTIVITIES BY TETRACYCLINE VIA A BIDIRECTIONAL PROMOTER" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 23, no. 17, 11 September 1995 (1995-09-11), pages 3605-3606, XP000775822 ISSN: 0305-1048 the whole document	1-18

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/03638

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 13-16 concern a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the alleged effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/03638

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1092771	A	18-04-2001	US 5654168 A	05-08-1997
			US 5789156 A	04-08-1998
			US 5866755 A	02-02-1999
			EP 1092771 A2	18-04-2001
			AU 3092395 A	25-01-1996
			AU 4456699 A	25-11-1999
			CA 2193122 A1	18-01-1996
			CN 1167504 A	10-12-1997
			DE 804565 T1	04-05-2000
			EP 0804565 A1	05-11-1997
			ES 2139552 T1	16-02-2000
			FI 965287 A	28-02-1997
			JP 11506901 T	22-06-1999
			NO 965623 A	28-02-1997
			WO 9601313 A1	18-01-1996
			US 6242667 B1	05-06-2001
			US 6136954 A	24-10-2000
			US 6004941 A	21-12-1999
			US 5589362 A	31-12-1996
			US 5814618 A	29-09-1998
			US 5912411 A	15-06-1999
			US 6271348 B1	07-08-2001
			US 2002152489 A1	17-10-2002
			US 2003022315 A1	30-01-2003
EP 1083227	A	14-03-2001	EP 1083227 A1	14-03-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03638

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/861 C12N15/63 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>NAKAGAWA SHINSAKU ET AL: "Tetracycline-regulatable adenovirus vectors: Pharmacologic properties and clinical potential" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, Bd. 13, Nr. 1, April 2001 (2001-04), Seiten 53-60, XP002258697 ISSN: 0928-0987 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-3,5-18



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Oktober 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/11/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03638

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
V	<p>STRATHDEE C A ET AL: "Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector"</p> <p>GENE, Bd. 229, Nr. 1-2, 18. März 1999 (1999-03-18), Seiten 21-29, XP004161154 ISSN: 0378-1119 Zusammenfassung; Abbildungen 1,2</p>	1-3,5-18
A	<p>EP 1 092 771 A (BASF AG ;KNOLL AG (DE)) 18. April 2001 (2001-04-18) Absatz '0059! Absatz '0087! - Absatz '0092! Absatz '0094! Abbildungen 6,7B</p>	1-18
A	<p>EP 1 083 227 A (UNIV BRUXELLES) 14. März 2001 (2001-03-14) Absatz '0056!; Abbildung 6</p>	1-18
A	<p>UNSINGER J ET AL: "Retroviral vectors for the transduction of autoregulated, bidirectional expression cassettes."</p> <p>MOLECULAR THERAPY: THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, Bd. 4, Nr. 5, November 2001 (2001-11), Seiten 484-489, XP002258698 ISSN: 1525-0016 Abbildungen 1,2</p>	1-18
A	<p>BARON U ET AL: "CO-REGULATION OF TWO GENE ACTIVITIES BY TETRACYCLINE VIA A BIDIRECTIONAL PROMOTER"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 23, Nr. 17, 11. September 1995 (1995-09-11), Seiten 3605-3606, XP000775822 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument</p>	1-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/03638

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 13-16 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03638

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1092771 A	18-04-2001	US 5654168 A	05-08-1997
		US 5789156 A	04-08-1998
		US 5866755 A	02-02-1999
		EP 1092771 A2	18-04-2001
		AU 3092395 A	25-01-1996
		AU 4456699 A	25-11-1999
		CA 2193122 A1	18-01-1996
		CN 1167504 A	10-12-1997
		DE 804565 T1	04-05-2000
		EP 0804565 A1	05-11-1997
		ES 2139552 T1	16-02-2000
		FI 965287 A	28-02-1997
		JP 11506901 T	22-06-1999
		NO 965623 A	28-02-1997
		WO 9601313 A1	18-01-1996
		US 6242667 B1	05-06-2001
		US 6136954 A	24-10-2000
		US 6004941 A	21-12-1999
		US 5589362 A	31-12-1996
		US 5814618 A	29-09-1998
		US 5912411 A	15-06-1999
		US 6271348 B1	07-08-2001
		US 2002152489 A1	17-10-2002
		US 2003022315 A1	30-01-2003
EP 1083227 A	14-03-2001	EP 1083227 A1	14-03-2001

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)